

Inflammation und Angiogenese in der frühen Phase der Frakturheilung bei spinalen Trauma

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Svenja Alexandra Schäfer

Aus der Klinik für Kleintiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuerin: Prof. Dr. med. vet. S. Wenisch

und

dem Universitätsklinikum Heidelberg
Department Orthopädie, Unfallchirurgie und Paraplegiologie
Betreuer: PD Dr. med. M. Egermann

Inflammation und Angiogenese in der frühen Phase der Frakturheilung bei spinalem Trauma

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Svenja Alexandra Schäfer
Tierärztin aus Eberbach

Gießen 2014

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachterin 1: Prof. Dr. med. vet. S. Wensch

Gutachter 2: PD Dr. med. M. Egermann

Tag der Disputation: 03.06.2014

Meinen Eltern und meinem Bruder,
die immer für mich da sind,
in Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1 Physiologische Frakturheilung	3
2.2 Knochenbildung bei Paraplegie.....	5
2.2.1 Heterotope Ossifikationen	7
2.2.2 Frakturheilung.....	12
2.2.3 Veterinärmedizinische Relevanz	14
2.3 Tiermodelle.....	15
2.3.1 Knochen- / Frakturheilung.....	15
2.3.2 Rückenmarksverletzungen.....	17
2.4 Vorausgegangene Studie	19
2.5 Zielsetzung	21
3. Material und Methoden	23
3.1 Studiendesign	23
3.2 Versuchstiere und Tierhaltung	23
3.3 Tierexperimente.....	24
3.3.1 Narkose und präoperative Vorbereitung.....	24
3.3.2 Femurosteotomie und -osteosynthese.....	25
3.3.3 Laminektomie und Kontusion	27
3.3.4 Postoperative Versorgung.....	30
3.4 Erfolgskontrolle der Rückenmarkskontusion	30
3.4.1 BBB-Score.....	31
3.4.2 Histologie des Rückenmarks	32
3.5 Probenaufbereitung und -untersuchung.....	32
3.5.1 Euthanasie und Perfusion	33
3.5.2 Entkalkung.....	35
3.5.3 Mikro-CT-Analyse	35
3.5.4 Histologie.....	40
3.5.5 Biochemische Marker	46
3.6 Statistische Analyse.....	47
4. Ergebnisse.....	48
4.1 Tierexperimente.....	48
4.2 Erzeugung der Rückenmarkskontusion	49
4.2.1 Impactorgraphen	49
4.2.2 BBB-Score.....	50

4.2.3	Histologie der Kontusionsstelle	52
4.3	Mikro-CT-Analyse	53
4.4	Histologie	54
4.5	Immunhistochemie	63
4.6	Biochemische Marker	67
4.6.1	VEGF	67
4.6.2	BALP	68
5.	Diskussion.....	69
5.1	Tiermodell	69
5.1.1	Wahl des Tier- und Operationsmodells	69
5.1.2	Narkose und Medikation.....	70
5.1.3	Knochen und Defektmodelle	71
5.1.4	Perfusion	73
5.1.5	Modell der Rückenmarksverletzung	75
5.2	Angiogenese	78
5.3	Inflammation	81
5.4	Osteogenese	84
5.5	Fazit	87
6.	Zusammenfassung	88
7.	Summary	90
8.	Literaturverzeichnis	91
9.	Tabellarischer Anhang.....	106
9.1	Material.....	106
9.1.1	Tierhaltungsmaterialien und OP-Bedarf.....	106
9.1.2	Medikamente	107
9.1.3	Chemikalien und Reagenzien	108
9.1.4	Puffer und Lösungen.....	108
9.1.5	Enzyme und Antikörper.....	109
9.1.6	Farblösungen und Kits	109
9.1.7	Verbrauchsmaterial.....	109
9.1.8	Geräte und Software	109
9.2	BBB-Score-Kategorien.....	111
9.3	Mittelwerte der Ergebnisse.....	113
9.3.1	Vessel Volume (mm ³).....	113
9.3.2	Vessel Surface (mm ²)	113
9.3.3	Anzahl der Gefäße (x pro mm ²).....	113

9.3.4	Flächenanteil von CD68-positiven Zellen am weichen Regenerationsgewebe (%)	113
9.3.5	VEGF-Konzentration im Plasma (pg / ml)	114
9.3.6	BALP-Konzentration im Plasma (ng / ml)	114
10.	Danksagung	115
11.	Erklärung	117

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hüftgelenk mit heterotoper Ossifikation.....	6
Abbildung 2: Schema veränderter Frakturheilung	14
Abbildung 3: Ergebnisse der Vorstudie	21
Abbildung 4: Operation Femurosteotomie.....	26
Abbildung 5: Osteotomiemodell und Instrumente	27
Abbildung 6: Operation Laminektomie und Rückenmarkskontusion.....	28
Abbildung 7: Geräte und Graphen der Rückenmarkskontusion	29
Abbildung 8: Auswertung der Neuroregeneration	31
Abbildung 9: Schema Probenaufbereitung und Untersuchungen	32
Abbildung 10: Perfusion	34
Abbildung 11: Mikro-CT-Analyse	37
Abbildung 12: Übersichtsröntgenbild eines entnommenen Femurs	39
Abbildung 13: Histologische Schnittebene	41
Abbildung 14: Auswertung der HE-Färbung mittels Knochenscore	44
Abbildung 15: Auswertung der Immunhistochemie	45
Abbildung 16: Impactorgraphen	49
Abbildung 17: Diagramm BBB-Score	50
Abbildung 18: Histologischer Schnitt des Rückenmarks.....	52
Abbildung 19: Diagramme der Angiographie	53

Abbildung 20: 3D-Darstellung der Gefäße im Defektbereich	54
Abbildung 21: Histologischer Nachweis von Microfil®	55
Abbildung 22: HE-Färbung nach 3 Tagen	56
Abbildung 23: HE-Färbung nach 7 Tagen	58
Abbildung 24: Periostale Knochenzubildung nach 14 Tagen	59
Abbildung 25: HE-Färbung nach 14 Tagen	60
Abbildung 26: Diagramm Gefäßanzahl	62
Abbildung 27: Beispiel einer Giemsa-Färbung	63
Abbildung 28: Makrophageneinwanderung im zeitlichen Verlauf	65
Abbildung 29: Diagramm Inflammation	66
Abbildung 30: Makrophageneinwanderung im Gruppenvergleich	67
Abbildung 31: Diagramme biochemischer Marker	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Versuchsgruppen der Vorstudie	20
Tabelle 2: Versuchsgruppen der vorliegenden Studie	23
Tabelle 3: Dosierung Anästhesie und Antidot	24
Tabelle 4: Parameter der Mikro-CT-Analyse	38
Tabelle 5: BBB-Scores	51
Tabelle 6: Analyse der Knochen- / Knorpelneubildung	61
Tabelle 7: Mittelwerte der Knochen- / Knorpelscores	62

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen

Aq. dest / Aq. bidest	Aqua destillata / bidestillata
ALP	Alkalische Phosphatase
ASCI	„Acut Spinal Cord Injury“
BALP	Knochenspezifische alkalische Phosphatase
bFGF	„Basic Fibroblast Growth Factor“
BMP	„Bone Morphogenetic Protein“
BSA	Bovines Serumalbumin
CGRP	„Calcitonin Gene- Related Peptide“
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
CT	Computertomographie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„Enzym-Linked Immunosorbent Assay“
FGF	„Fibroblast Growth Factor“
HCl	Salzsäure
HO	Heterotope Ossifikation
IGF	„Insulin-Like Growth Factor“
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
KG	Körpergewicht
Mikro-CT	Mikro-Computertomograph
MSC	Mesenchymale Stammzellen
NaCl	Natriumchlorid
NSAIDs	Nichtsteroidale Antiphlogistika
PDGF	„Platelet Derived Growth Factor“
PFA	Paraformaldehyd
PTH	Parathormon
RT	Raumtemperatur
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
TGF	„Transforming Growth Factor“
Th 8 / 9 / 10	Thorakaler Wirbel 8 / 9 / 10

TNF- α	Tumornekrosefaktor α
VAA	Vollständig antagonisierbare Anästhesie
VEGF	„Vascular Endothelial Growth Factor“
ZNS	Zentrales Nervensystem

Einheiten	
cm	Zentimeter
d	Tag
g	Gramm
h	Stunde
kg	Kilogramm
μ g	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
ms	Millisekunde

1. Einleitung

Die Folgen einer Querschnittslähmung sind weitreichend. Sie beziehen sich nicht alleine auf die Einschränkung der Bewegungsfreiheit. Zu der verminderten Mobilität und Selbständigkeit der Patienten kommen häufig klinisch relevante Ereignisse, wie die Bildung einer heterotopen Ossifikation (HO). Dabei handelt es sich um Verknöcherungen, die im Weichteilgewebe auftreten und erhebliche Probleme verursachen können. Im Kurzbericht 2011 über die Statistik schwerbehinderter Menschen des Statistischen Bundesamtes erscheinen 16.911 Menschen, die in Deutschland von einer Querschnittslähmung betroffen sind. Davon sind 6.583 traumatisch bedingt. Jährlich kommen ca. 1500 – 1800 neue Fälle hinzu (Hofmann and Röhl 2010). Bei ihnen kommt es in 40 – 50 % zu solch einer heterotopen Knochenbildung (Aubut et al. 2011).

Die knöchernen Ablagerungen kommen in der Regel in direkter Nachbarschaft zu größeren Gelenken vor und werden durch klinische Erscheinungen, wie Rötung, Schwellung und bei erhaltener Sensibilität auch durch Schmerzen, begleitet. Aufgrund zunehmender Größe der HOs kommt es zunächst zu leichten Funktionseinschränkungen des betroffenen Gelenkes, welche sich bis zu dessen Funktionslosigkeit durch eine vollständige Ankylose weiterentwickeln können. Hinzu kommt ein erhöhtes Risiko für Druckstellen und Thrombosen.

Bereits vor mehreren Jahrzehnten wurden bei querschnittsgelähmten Patienten neben heterotopen Ossifikationen auch Divergenzen in der Knochenheilung beobachtet (Comarr et al. 1962). Geht eine akute Schädigung des Rückenmarks zeitgleich mit Frakturen an Röhrenknochen einher, können überschießende Kallusformationen beobachtet werden. Des Weiteren wird der Frakturspalt in einer kürzeren Zeitspanne überbrückt. Die gesteigerte Knochenbildung wurde sowohl bei Vorhandensein einer akuten Schädigung des Rückenmarks als auch bei einem Schädel-Hirn-Trauma beobachtet. Selbst intensive Forschungen auf diesem Gebiet konnten die genauen Pathomechanismen hinter den Phänomenen bisher nicht aufklären. Ob es sich im Falle der Frakturheilung um eine tatsächlich gesteigerte Osteogenese handelt oder ob lokal auftretende HOs den Kallus vergrößern, ist ebenfalls umstritten (Roberts 1968; van Kuijk et al. 2002).

Aufgrund der bereits angesprochenen Gelenkkontrakturen und Funktionseinschränkungen sind betroffene Personen erheblich in ihrer Aktivität und Mobilität, aber auch in ihrer Sitz- und Liegefähigkeit sowie in ihrer Selbständigkeit und Selbstversorgung eingeschränkt (Akbar et al. 2007). Neben dieser enormen Belastung der Patienten besteht zudem ein erhöhter Pflege- und Kostenaufwand bei der täglichen Versorgung (Akbar et al. 2007). Kenntnisse über den Pathomechanismus der Entstehung von HOs sind daher von immenser Bedeutung. Sie könnten eine Reihe von prophylaktischen und therapeutischen Maßnahmen ermöglichen und so die Lebensqualität betroffener Patienten verbessern. Neben der Möglichkeit HOs vorzubeugen und bestehende Fälle wirksam zu behandeln, könnten die Erkenntnisse ebenso zur Induktion und Unterstützung einer beeinträchtigten Knochenheilung verwendet werden, was im Falle einer Pseudarthrose von Nutzen wäre.

Zielsetzung

Diverse Studien beobachten seit Jahrzehnten eine veränderte Knochenbildungsneigung nach spinalem Trauma. Die Ergebnisse einer Vorstudie haben gezeigt, dass dieser in der Klinik beobachtete Effekt einer gesteigerten Knochenbildung bei zentraler Nervenschädigung auch im Tiermodell vorhanden und reproduzierbar ist (siehe 2.4).

Signifikante Unterschiede in der Kallusgröße konnten dabei nach 14 Tagen, nicht aber nach 28 Tagen nachgewiesen werden, was auf eine Veränderung der frühen Frakturheilungsphase hinweist. Die beiden entscheidenden Vorgänge der Knochenheilung in der frühen Phase sind Inflammation und Angiogenese. Diese Studie sollte daher mögliche Unterschiede der beiden Geschehnisse innerhalb der ersten Tage (3, 7 und 14 d) nach Trauma aufdecken.

Nach Kontrastmittelperfusion wurden im Defektspace Volumen und Oberfläche von Gefäßen mit Hilfe von Mikro-Computertomographen-(Mikro-CT)-Scans berechnet und deren Anzahl histologisch bestimmt. Als Variable der Inflammation wurde die Einwanderung von CD68-positiven Zellen untersucht. Zudem wurden Blutplasmakonzentrationen vom *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) und der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase (BALP) bestimmt.

2. Literaturübersicht

2.1 Physiologische Frakturheilung

Bei einer Fraktur kommt es nicht nur zu Verletzungen der Knochen- und Knochenmarkstruktur. Auch das umliegende Weichteilgewebe, einschließlich der Gefäße, wird in Mitleidenschaft gezogen. Die aktivierten Mechanismen bei der Frakturheilung haben somit die Aufgabe, verschiedene Gewebearten zu reparieren. Unterteilt ist der Vorgang in Entzündung, reparative Phase (Formation des weichen Kallus; Formation des harten Kallus) und *Remodeling* (Umstrukturierung des Kallus zu Knochen). Auf molekularer Ebene wird er durch proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren, proosteogene Faktoren und Angiogenesefaktoren koordiniert und vorangetrieben (Schindeler et al. 2008).

Die erste Phase dauert ca. eine Woche und wird mit Einwirken des Traumas initiiert. Es kommt zu Zerreißen von Weichteilgewebe und Gefäßen. Die Gerinnungskaskade wird aktiviert und bringt die Blutung zum Stillstand. Dabei werden Faktoren freigesetzt, die als chemotaktische Signale wirken und den Leukozyten als Migrationshilfe dienen. Makrophagen und Entzündungszellen infiltrieren das Frakturhämatom, sezernieren Zytokine und Wachstumsfaktoren und helfen bei der Bildung eines fibrinösen Thrombus (Einhorn 1998; Gerstenfeld et al. 2003). Dieser verhindert weitere Blutungen und dient als Fibrinnetzwerk der zellulären Migration. Durch die Verletzung des Gefäßsystems ist das Milieu in dieser frühen Phase der Inflammation hypoxisch und sauer, wodurch für polymorphonukleäre Leukozyten und Gewebsmakrophagen optimale Bedingungen vorherrschen (Hollinger and Wong 1996). Abgestorbene Zellen und Fremdkörper werden phagozytiert und abtransportiert. Makrophagen haben zu diesem Zeitpunkt der Frakturheilung eine zentrale Stellung. Sie sind nicht nur für den Abbau zuständig, sondern scheinen die Organisatoren vieler Vorgänge zu sein. Sie sezernieren über 100 Substanzen, darunter PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), TGF- β (*Transforming Growth Factor - β*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*), IGF (*Insulin-Like Growth Factor*) (Nathan 1987), außerdem angiogenesestimulierende Faktoren (Glowacki 1998). Somit produzieren sie alle wichtigen Faktoren, die an der Regeneration beteiligt sind.

Eine ausreichende Sauerstoffversorgung ist grundlegend. Kapillaren beginnen in den Thrombus einzusprießen, der nach und nach in Granulationsgewebe umgebaut wird. Wichtig sind hierbei vor allem TGF- β , PDGF, FGF-2, VEGF, IL-1 und -6 (Interleukin- 1 bzw. -6), BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*) und TNF- α (Tumornekrosefaktor – α) (Bolander 1992; Einhorn 1998; Gerstenfeld et al. 2003). Durch Schmerz und Schwellung hilft diese erste Phase der Frakturheilung die betroffene Region weitgehend zu immobilisieren (Madison and Martin 1993).

Die reparative Phase dauert mehrere Wochen und resultiert in einem Kallus, der den Frakturspalt überbrückt. Die Kallusbildung ist hierbei auch abhängig von der mechanischen Stabilität. Bei einer absolut starren Fixierung kann durch desmale Ossifikation Knochen gebildet werden (primäre Knochenheilung). In den meisten Fällen ist jedoch eine geringfügige Beweglichkeit gegeben und die Knochenbildung erfolgt über enchondrale Ossifikation (sekundäre Knochenheilung). In diesem Falle wird der weiche Kallus durch Chondrozyten und Fibrozyten gebildet. Zeitgleich zu dem Abbau nekrotischer Zellen werden mesenchymale Stammzellen angeregt zu differenzieren und die Grundlage neuer Zellen im Frakturbereich zu bilden. Separate Knorpelregionen entwickeln sich, die im Laufe der Zeit fusionieren und den Frakturspalt innerhalb von 2 Wochen überbrücken (Einhorn 1998; Barnes et al. 1999). Chondrozyten beginnen zu hypertrophieren und die knorpelige Matrix zu mineralisieren. Hierfür müssen Glykosaminoglykane abgebaut und Kalziumphosphate freigesetzt werden. Der pH-Wert steigt im Verlauf der Kallusbildung an und wird neutral bis leicht alkalisch. Somit werden optimale Bedingungen für die Alkalische Phosphatase (ALP) und deren Funktion in der Mineralisation geschaffen (Buckwalter and al. 1996). Der Vorgang der Angiogenese und des Einsprossens von Gefäßknospen wird v.a. durch VEGF, BMPs, FGF-1 und TGF- β verwirklicht (Kalfas 2001; Deckers et al. 2002; Gerstenfeld et al. 2003). In der folgenden Phase der Osteogenese wird der instabile, knorpelige Kallus durch Geflechtknochen ersetzt. Entlang der Gefäße wandern phagozytierende Zellen in die Mitte des Knorpels und resorbieren das Innere. So entsteht eine Höhle, in die Osteoprogenitorzellen einwandern und im Beisein osteogener Faktoren zu Osteoblasten differenzieren. Durch umgehende und ungerichtete Produktion von osteogener Matrix entsteht der Geflechtknochen.

In der Phase des *Remodelings* wird der Geflechtknochen durch Lamellenknochen ersetzt und das überschüssige Kallusgewebe abgebaut. So werden die biomechanischen Eigenschaften des verletzten Knochens schrittweise wiederhergestellt (Parfitt 1988; Peck and Woods 1988).

Der Vorgang findet solange statt, bis die ursprüngliche Knochenstruktur wiedererlangt wurde (Madison and Martin 1993). Die beteiligten Osteoklasten sezernieren Säure, um osteogene Matrix zu demineralisieren und phagozytieren die anfallenden Abbauprodukte. Einwirkende mechanische Kräfte im Heilungsverlauf sind wesentlich an der Ausrichtung des Lamellenknochens beteiligt (Wolff'sches Gesetz).

Die Vorgänge sind dieselben, die auch bei dem *Remodeling* eines intakten Knochens ein Leben lang stattfinden. Allerdings können sie über Jahre hinweg vermehrt oder beschleunigt im Frakturbereich auftreten (Wendeberg 1961).

2.2 Knochenbildung bei Paraplegie

Nach Verletzungen des zentralen Nervensystems wird häufig eine Veränderung der Knochenbildung beobachtet. Klinisch stellt sich das durch das Auftreten heterotoper Ossifikationen (HOs) dar. Sind zeitgleich Knochenverletzungen vorhanden, kann es auch zu überschießender Kallusbildung kommen. Die genauen Mechanismen der gesteigerten Ossifikation sind noch nicht geklärt. Es wird vermutet, dass sowohl lokale als auch humorale und neuronale Faktoren eine Rolle spielen. Ob die größere Kallusmasse durch eine gesteigerte Osteogenese bedingt ist oder ob lokal im Frakturbereich auftretende HOs den Kallus vergrößern, ist ungeklärt.

Vereinzelt gibt es Berichte über verminderte Knochendichte bzw. verzögerte Frakturheilung nach Rückenmarksverletzungen (Jiang et al. 2007; Morse et al. 2008; Ding et al. 2011). Der überwiegende Teil der Forschungsergebnisse und die klinischen Beobachtungen lassen jedoch eine gesteigerte Neigung zur Knochenneubildung bei betroffenen Patienten erkennen.

Strikt abgegrenzt werden muss dieses Phänomen von einer verzögerten Knochenheilung, die bei langjähriger Querschnittslähmung in Folge einer Inaktivitätsosteoporose beobachtet werden kann. In diesen Fällen treten die schlecht heilenden Knochenverletzungen erst nach jahrelangem Bestehen einer Paraplegie auf. Bedingt durch die oftmals subklinische Osteoporose unterscheidet sich der Heilungsverlauf daher von Fällen mit akuter, zeitgleicher Verletzung des zentralen Nervensystems und des knöchernen Skelettsystems (Wenger et al. 1980; Marreiros et al. 2012).

Auf der Suche nach osteoinduktiven Faktoren, die sowohl für das Auftreten von HOs als auch für überschießende Kallusbildung verantwortlich sein könnten, überschneiden sich die beiden Forschungsbereiche von Frakturheilung und HO-Bildung bei Paraplegie. Es wird nicht ausgeschlossen, dass es sich um ein und denselben Mechanismus handelt. Aus diesem Grund ist es von Bedeutung ebenfalls Hintergründe der HO genauer zu beleuchten.

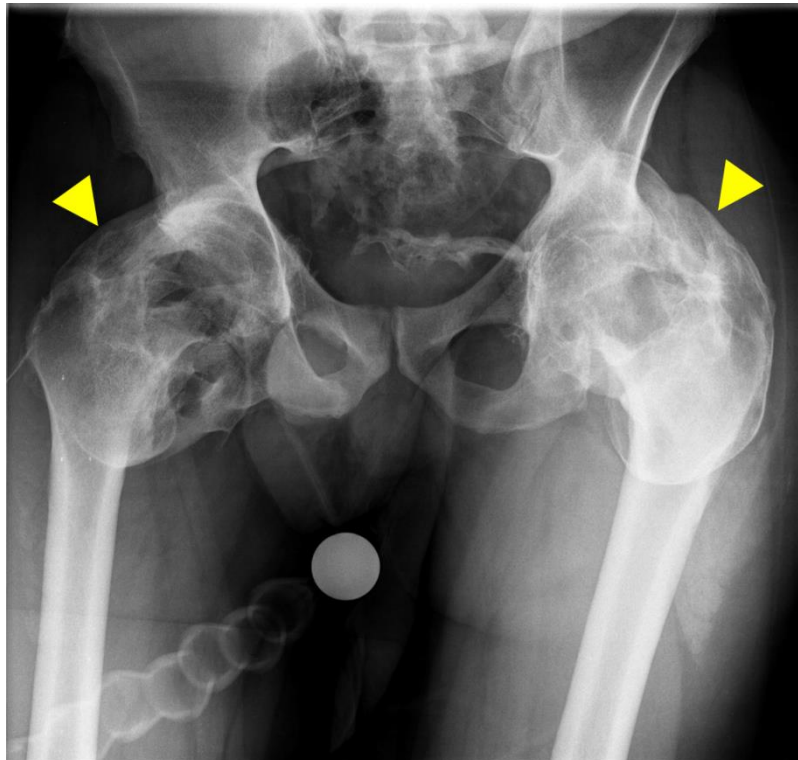


Abbildung 1: Hüftgelenk mit heterotoper Ossifikation

Röntgenbild einer Hüfte mit hochgradiger HO beidseitig (Pfeilspitzen); 35-jähriger männlicher Patient; 1,5 Jahre nach schwerem Schädel-Hirn-Trauma (Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie am Universitätsklinikum Heidelberg).

2.2.1 Heterotope Ossifikationen

Als heterotope Ossifikation bezeichnet man die Bildung von lamellären Knochen außerhalb des knöchernen Skelettsystems, folglich im Weichteilgewebe (Abb. 1). Anhand der Anwesenheit von Osteoblasten kann dieser leicht von einer einfachen Verkalkung abgegrenzt werden, wie sie bei einer Hyperkalzämie auftreten kann (Cope 1990; Ekelund et al. 1991). Eine vollständig entwickelte HO beinhaltet zudem Haver-Kanäle, Blutgefäße und Knochenmark (Damanski 1961; Friedenstein et al. 1968; Wang et al. 2004).

Ursachen

Eine HO kann durch verschiedene Ursachen ausgelöst werden. *Genetische* HOs treten äußerst selten auf und kommen im Falle der Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) durch eine Überexpression von BMP-4 (Shafritz et al. 1996; Ahn et al. 2003) und eine verminderte Expression von dessen Antagonisten (Feldman et al. 2000; Kaplan et al. 2004) zustande. Liegen einer HO keine genetischen Ursachen zu Grunde, treten sie post-traumatisch, post-operativ oder in Verbindung mit Verletzungen des zentralen Nervensystems (ZNS) auf.

Die Inzidenzen einer neurogenen HO (nach Verletzungen des ZNS) schwanken sehr stark, abhängig von Studiendesign, Studienintervall, Methode der Datenbeschaffung und Beobachtungszeitraum (Stover et al. 1991). Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma (SHT) entwickeln in ca. 10 – 20 % der Fälle eine HO (Garland 1991; Aubut et al. 2011), während Patienten mit Rückenmarksverletzungen häufiger betroffen sind. Hier kommt es bei 40 % – 50 % der Patienten zur ektopen Knochenbildung (Aubut et al. 2011). Das am häufigsten betroffene Gelenk ist die Hüfte, gefolgt von Knie- und Ellenbogengelenk. Die Knochenablagerungen finden in direkter Umgebung zur Gelenkkapsel statt, ohne diese einzuschließen. In vielen Fällen kommt es zu keiner klinischen Einschränkung. Bei zunehmenden Ablagerungen reichen die Folgen jedoch von geringfügiger Beeinträchtigung der Gelenkbeweglichkeit bis hin zur vollständigen Ankylose und können mit starken Schmerzen verbunden sein. Die Ablagerungen beginnen meist innerhalb der ersten zwei Monate nach neuronaler Verletzung und sind mit ca. 6 bis 18 Monaten ausgereift (Wharton and Morgan 1970; Venier and Ditunno 1971; Orzel and Rudd 1985; Garland 1991).

Risikofaktoren

Aufgrund Beobachtungen in klinischen Studien können Risikofaktoren für die Entwicklung einer HO benannt werden. Die Bildung neurogener HOs korreliert unter anderem mit lang anhaltendem Koma, einschließlich künstlicher Beatmung, passiven Gelenkbewegungen und Muskelspasmen. Außerdem treten neurogene HOs öfter beim männlichen Geschlecht und in einer Altersgruppe bis 30 Jahren auf (Cipriano et al. 2009). Forschungen in diese Richtung zeigen, dass die Sauerstoffversorgung einen Einfluss auf die Osteogenese hat. Niedrige Sauerstoffkonzentrationen fördern die Knochenzellproliferation, hohe steigern die Synthese von Makromolekülen (Brighton et al. 1991). Daher wird vermutet, eine künstliche Beatmung unterstütze durch lokal verminderte Sauerstoffkonzentration, die Bildung einer HO bzw. ermögliche schnellere Kallusformationen bei der Frakturheilung (Newman et al. 1987). Ähnliche Annahmen gibt es zu den Muskelspasmen, die gleichfalls eine Hypoxie im Gewebe verursachen (van Kuijk et al. 2002). HOs in Zusammenhang passiver Gelenkmobilisationen werden auf Mikrotraumen zurückgeführt. In einem Kaninchenmodell zeigten Michelsson et al., dass die passive Kniegelenkbewegung an immobilisierten Hinterläufen heterotope Knochenbildung im Quadrizeps induziert (Michelsson et al. 1980). Ändert man die Knieposition während der Kniebewegungen, verändert sich die Lokalisation des neugebildeten Knochens (Michelsson and Rauschnig 1983).

Als begünstigende Faktoren für die HO-Entstehung werden zusätzlich Dekubitus und Thrombosen (Akbar et al. 2007) sowie anhaltende Schwellungen (Milgram 1990) genannt. Allerdings ist zu diskutieren, ob diese Erscheinungen ursächlich oder folgeschädlich auftreten, da sie in der Literatur auch als klinische Symptome einer HO zu finden sind (Garland 1991; Wittenberg et al. 1992).

Pathogenese

Die Pathogenese scheint abhängig von dem neurologischen Trauma zu differieren. Bei einer Rückenmarksverletzung (RMV) ist eine HO meist nur an einem Gelenk zu finden, während SHT-Patienten Ablagerungen an mehreren Gelenken aufweisen (Cipriano et al. 2009). HOs bei RMV sprechen besser auf nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs) an, wohingegen solche bei SHT öfter operiert werden müssen (Aubut et al. 2011). Auch die genaue Lokalisation der Knochenablagerungen ist verschieden. Bei Patienten mit RMV sind sie hauptsächlich ventral am Hüftgelenk zu finden (Garland 1991; Abel et al. 2002), während bei

SHT die Ossifikationen eher ungerichtet und medial vorhanden sind (Garland 1988; Stockhammer et al. 1992). Histologisch sind in der frühen Phase einer HO mikrovaskuläre Veränderungen, Gefäßstauungen und lokale Ödeme zu sehen. Nach Fibroblasten- und Osteoblastenproliferation beginnen die Osteoidbildung und der Reifevorgang zum ektopen Knochen (Vanden Bossche and Vanderstraeten 2005).

Die auslösenden Mechanismen scheinen den pathophysiologischen Vorgängen bei der Frakturheilung sehr ähnlich zu sein. Als Voraussetzungen für eine physiologische Frakturheilung gelten Osteogenese, Osteoinduktion und Osteokonduktion (Nauth et al. 2012). Nach der weit verbreiteten Ansicht von Chalmers et al. sind die Voraussetzungen für eine HO quasi identisch: osteogene Vorläuferzellen, osteoinduktiver Faktor und eine geeignete Umgebung (Chalmers et al. 1975).

Als *Vorläuferzellen* kommen unter anderem periostale Osteoblasten in Frage. Michelsson et al. (1980) sahen nach HO-Induzierung in Kaninchen die ersten Anzeichen von Osteoblastenaktivität im Periost, und der sich bildende Knochen war in Verbindung mit diesem entstanden. Cadosch et al. entdeckten dagegen spindelförmige, Vimentin-positive Zellen im Muskel als Vorläuferzellen der mineralisierten Knötchen im Anfangsstadium einer HO. Diese konnten aufgrund von Morphologie, mRNA und immunchemischen Eigenschaften mesenchymalen Stammzellen, Bindegewebszellen des Knochenmarks und Perizyten zugeordnet werden (Cadosch et al. 2010).

Unabhängig vom Querschnittsniveau entwickeln sich HOs auch kranial der spinalen Läsion, weshalb ein verursachender, systemischer Faktor denkbar ist. Als *osteoinduktive Signale* kommen demnach viele humorale Faktoren in Frage. Spekuliert wird unter anderem über eine Produktion und Abgabe von Faktoren durch das lädierte Nervengewebe selbst, welche bei verletzter Blut-Hirn-Schranke von der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) in den Blutkreislauf übertreten und systemisch verteilt werden könnten. Unterstützt wird diese Theorie durch eine Studie von Gautschi et al. (2007), in der CSF von Patienten mit SHT mit humanen fetalen Osteoblasten inkubiert wurde und so zu deren Proliferationssteigerung führte. Ein osteoinduktiver Effekt von CSF konnte auch im Tiermodell gezeigt werden. Hier erhöhte das CSF von Tieren mit SHT die Proliferation von Bindegewebszellen des Knochenmarks (Klein et al. 1999). Ein auslösender Faktor konnte noch nicht ausgemacht werden. Als vielversprechende Faktorengruppe werden die BMPs angesehen, da sie in der Lage sind, die Osteogenesekaskade *in vitro* und *in vivo* im Tiermodell zu aktivieren (Wozney 2002).

Hinweise auf deren Beteiligung gibt die genetische HO, bei der die BMP-Signalwege durch Mutation gestört sind. Zudem zeigten sich BMP-Antagonisten im Tiermodell als effektive HO-Prophylaxe (Hannallah et al. 2004). Gautschi et al. schließen jedoch eine ursächliche Beteiligung von BMPs aus. Die Konzentration sei nicht hoch genug, um die Zellantwort auszulösen, die eine HO triggert (Gautschi et al. 2007). Auch ist es fraglich, ob durch die limitierte systemische Verfügbarkeit der BMPs lokal überhaupt hohe Konzentrationen erreicht werden können (Termaat et al. 2005). Möglich wäre der Einfluss von BMPs in Zusammenhang mit inflammatorischen Signalen (Nauth et al. 2012). Für die Bedeutung einer entzündlichen Komponente sprechen die bei HO-Patienten nachgewiesenen, erhöhten Werte von IL-6 (Evans et al. 2012) und die als gängige und wirksame Methode der Prophylaxe bekannte Verwendung von NSAIDs.

Neben der CSF selbst sind auch Veränderungen im Blutserum bei der Ursachensuche von Interesse. In Verbindung mit Läsionen des Nervensystems werden bei einigen Faktoren Konzentrationsverschiebungen gefunden. Von großem Interesse sind vor allem Faktoren, die einen Einfluss auf mesenchymale und osteogene Proliferation haben könnten. Nach Verletzungen des zentralen Nervensystems steigt beispielsweise die ALP-Konzentration (Wittenberg et al. 1992), ebenso Parathormon (PTH) (Trentz et al. 2005; Gautschi et al. 2009). Osteocalcin dagegen ist signifikant vermindert (Trentz et al. 2005). Die Schwierigkeit besteht darin, die gefundenen, veränderten Serumkonzentrationen mit einer HO-Induzierung in Verbindung zu bringen. So steigt alleine durch eine Fraktur die bFGF-Konzentration (*Basic Fibroblast Growth Factor*) um das Dreifache. Liegt zusätzlich ein SHT vor, steigt sie sogar auf die siebenfache Menge an (Wildburger et al. 1994). Trotzdem konnten mit dem Serum betroffener Patienten keine Auswirkungen auf die Fibroblastenproliferation *in vitro* beobachtet werden (Wildburger et al. 1995). Auch Versuche IL-6 (Beeton et al. 2004), Leptin (Rigaux et al. 2005), IGF (Wildburger et al. 2001; Beeton et al. 2002), Prolactin (Wildburger et al. 1998), PTH (Trentz et al. 2005) und auch ALP (Pape et al. 2001; Cadosch et al. 2010) mit einer HO in Verbindung zu bringen sind bislang fehlgeschlagen.

Neben humoralen Faktoren sind auch andere Mechanismen, wie z.B. eine autonome Dysregulation des Nervensystems durch die eingetretene Verletzung, denkbar. Untersuchungen von Major et al. zeigten, dass Sympathikusaktivitäten lokale Gewebeveränderungen hervorrufen können, die sich histologisch auch im Anfangsstadium einer HO zeigen (Major et al. 1980).

Als dritte Voraussetzung einer HO muss eine *geeignete Umgebung* vorliegen. Welche Bedingungen gegeben sein müssen, um diese zu erzeugen, ist ungewiss. Nachgewiesene lokale Veränderungen im Bereich einer bestehenden HO sind sowohl Salzablagerungen, Elektrolytverschiebungen und Gewebhypoxie als auch Änderungen im pH-Wert und ein lokales Ungleichgewicht von PTH und Calcitonin (Shehab et al. 2002). Allerdings ist eine ganze Reihe an Umgebungsveränderungen auch bei den pathophysiologischen Vorgängen einer normalablaufenden Frakturheilung nachweisbar (Laurin and Kelly 1969).

Michelsson et al. äußern den Verdacht einer Interaktion von nekrotischen Muskelzellen und Zellen des Periosts. Die erste Osteoblastenaktivität von im Tiermodell induzierten HOs konnte im Periost entdeckt werden und der neugebildete Knochen wies eine Verbindung zu diesem auf (Michelsson et al. 1994). Außerdem wurde durch Platzierung einer Plastikmembran zwischen Knochen und Periost die HO-Bildung verhindert (Michelsson et al. 1994).

Klinik

In vielen Fällen verursachen heterotope Ossifikationen keinerlei klinische Auffälligkeiten und werden nur zufällig entdeckt. Treten allerdings Probleme auf, sind diese oft erheblich. Zunächst zeigen sich periartikuläre Schwellungen und Weichteilödeme im Bereich des betroffenen Gelenkes (Chantraine and Minaire 1981; Garland 1991; Taly et al. 1999). Auch Wärme und Rötungen können beobachtet werden (Tow and Kong 1995). Bei erhaltener Sensibilität klagen Patienten über Schmerzen (Wharton and Morgan 1970), die wohl durch die vorhandene Entzündung, aber auch durch eingeklemmte Nervenbahnen bedingt sind. Zunehmende Knochenablagerungen um die Gelenke verursachen eine Einschränkung der Beweglichkeit. Bei fortschreitender Osteogenese bilden sich Knochenspannen von enormer Größe, die Gelenke vollständig überbrücken und in einer Ankylose resultieren können. Die gebildeten Knochenmassen führen zu Druckstellen und Hautulzerationen (Garland 1991). Außerdem erhöhen sie durch Einengung der Blutgefäße das Risiko einer Thrombose bzw. einer Embolie (Orzel et al. 1984). Da es sich bei dem betroffenen Gelenk meistens um die Hüfte handelt, verlieren Patienten durch die eingeschränkte Beweglichkeit die Fähigkeit des Transfers über die Stehposition und die Möglichkeit eine adäquate Sitzposition einzunehmen (Garland 1991).

2.2.2 Frakturheilung

Bereits vor Jahrzehnten wurden Ärzte auf Besonderheiten der Knochenheilung bei Patienten aufmerksam, die neben Frakturen gleichzeitig unter neurologischen Schäden litten (Comarr et al. 1962; Eichenholtz 1963). Es wurde von kürzeren Heilungszeiten und verstärkter Bildung von Kallusgewebe berichtet (Perkins and Skirving 1987; Spencer 1987). Da in paraplegischen Patienten regelmäßig auch HOs zu finden sind, wird eine erhöhte Neigung zur Knochenneubildung vermutet. Literatur über diese Thematik ist rar und die meisten Studien untersuchen Auswirkungen auf die Osteogenese durch ein SHT, nur sehr wenige beschäftigen sich mit RMV.

Es gibt verschiedene Überlegungen für die Ursache der veränderten Knochenbildung. Die Hypothese, ein humoraler Faktor könnte ursächlich beteiligt sein, ist wohl, ähnlich der Entstehung einer HO, die am häufigsten untersuchte und diskutierte Annahme. Auch hier stehen lokale und systemische Faktoren unter Verdacht (Perkins and Skirving 1987; Spencer 1987). Dies ist denkbar aufgrund der bereits angesprochenen veränderten Serumkonzentrationen verschiedener Marker, die bei neurologischen Traumapatienten nachgewiesen werden können (siehe 2.2.1 HO-Pathogenese). Studien zeigen außerdem veränderte Eigenschaften des Blutserums von Tieren bzw. Patienten, die sowohl ein SHT als auch Frakturen erlitten haben. In diesem Fall wird *in vitro* die Proliferation verschiedener Zelllinien stärker erhöht als durch das Serum von Tieren oder Patienten mit alleinigem SHT (Bidner et al. 1990; Boes et al. 2006; Gautschi et al. 2009).

Boes et al. (2006) untersuchten die Auswirkungen von Rattenserum aus Tieren mit SHT und Frakturen auf die Proliferation von verschiedenen Zelllinien *in vitro*. Eine erhöhte Zellteilungsrate konnte in seiner Studie lediglich bei mesenchymalen Stammzellen (MSCs), nicht aber bei Fibroblasten oder Osteoblasten ausgelöst werden. Im Gegensatz hierzu konnten Gautschi et al. (2009) sowohl eine erhöhte Proliferation humaner Osteoblasten demonstrieren als auch eine vermehrte Differenzierung von deren Vorläuferzellen, was mit Ergebnissen von Bidner et al. (1990) im Einklang steht. Diese zeigten, dass sogar Humanserum von Patienten mit SHT und Frakturen eine signifikante Steigerung der Zellproliferation von Rattenosteoblasten vermitteln kann.

Die Ergebnisse genannter Studien lassen, unabhängig der betroffenen Zelllinien, einen systemischen Faktor vermuten, der die Osteogenese anregt. Andermahr et al. sahen ebenfalls

eine überschießende Kallusbildung, postulierten aber, dass diese nicht Folge einer vermehrten Knochensynthese sei, sondern sekundär aufgrund eines verminderten Knochenabbaus entstehe (Andermahr et al. 2006).

Andere Forscher konnten dagegen keine verstärkte mitogene Eigenschaft von Serum nachweisen und vertreten die Meinung, die Vorgänge der Frakturheilung seien gänzlich unbeeinflusst. Statt einer beschleunigten Heilung sollen sich lokal im Bereich des Frakturspalts HOs manifestieren, die den Kallus vergrößern bzw. zur schnelleren Reifung verhelfen (Roberts 1968; Citta-Pietrolungo et al. 1992; Taly et al. 1999; van Kuijk et al. 2002). Auch histologisch ähnelt ein Kallus bei SHT-Patienten eher einer HO als einer normalen Knochenstruktur (Spencer 1987).

Statt dem am meisten diskutierten, humoralen Faktor könnte dem Phänomen auch ein parakriner Wirkmechanismus zu Grunde liegen. Zhang et al. untersuchte Konzentrationen von CGRP (*Calcitonin Gene- Related Peptide*) im Hinblick auf die Frakturheilung bei SHT, RMV und N. ischiadicus-Läsion (Zhang et al. 2009). Hierfür nahm er Proben aus dem Serum, dem oberen Motoneuron und dem Spinalganglion. Im Serum zeigten sich keinerlei Abweichungen des CGRP-Spiegels, die Nervengewebeproben dagegen zeigten erhöhte CGRP-Werte. Zudem war der knöcherne Kallus bei zentraler Nervenläsion größer und bei peripherer Nervenläsion kleiner ausgebildet als in Kontrolltieren. Daher vermuten die Autoren einen axonalen Transport von CGRP zur Frakturregion mit einer parakrinen Wirkung vor Ort. Durch eine periphere Nervenläsion könnte der Transport unterbrochen werden und in der verminderten Kallusgröße resultieren.

Während Zhang et. al (2009) demnach auf eine negative Beeinflussung von peripheren Nervenläsionen auf die Frakturheilung schließen, wurden Ergebnisse veröffentlicht, die das Gegenteil aufzeigen. Aro untersuchte die Heilung von Tibiafrakturen bei gleichzeitigen Ischiasläsionen und beobachtete eine schnellere Spaltüberbrückung (Aro 1985). Ähnliche Resultate über eine positive Wirkung zeigten sich auch in der Vorstudie (siehe 2.4). Neben zentralen Nervenläsionen scheinen also, ungeachtet der Auswirkungsart, auch periphere Läsionen einen Einfluss auf die Knochenbildung zu nehmen.

Eine weitere Hypothese für die Ursache von größerem Kallusgewebe und kürzeren Heilungszeiten schließt die künstliche Beatmung von Intensivpatienten ein. Die Präzipitation von Kalziumphosphat kann z.B. durch ein alkalisches Milieu gefördert werden (Boulet and

Marier 1961). Newman et al. wiesen einen leicht erhöhten Blut-pH-Wert bei beatmeten Patienten von 7,49 nach (Referenzwert 7,35 – 7,45) und erklärten so die von ihnen beobachtete, schnellere Kallusformation (Newman et al. 1987).

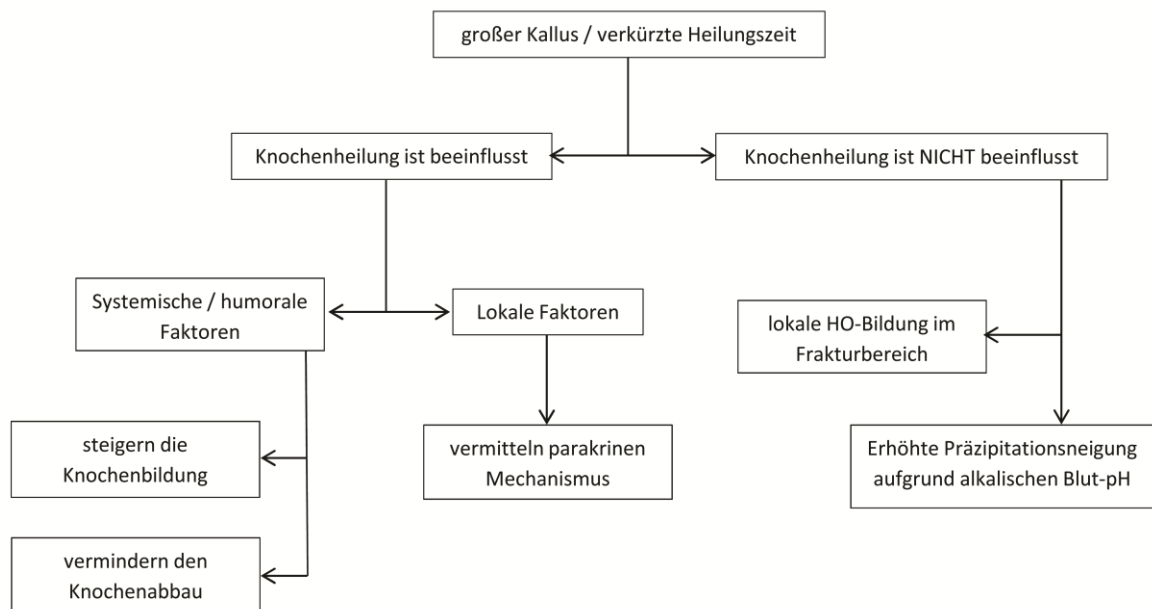


Abbildung 2: Schema veränderter Frakturheilung

Schema über mögliche Ursachen veränderter Frakturheilung nach neuronaler Schädigung.

2.2.3 Veterinärmedizinische Relevanz

In der Literatur gibt es keine Hinweise, dass der Effekt einer gesteigerten Osteogenese oder Kallusbildung in Verbindung mit neuronaler Schädigung auch bei unseren Haussäugetieren beobachtet oder untersucht wurde. Dies ist wohl auf die relativ geringe Anzahl querschnittsgelähmter Tiere in menschlicher Obhut zurückzuführen, deren Besitzer neben der eingeschränkten gesellschaftlichen Akzeptanz gegenüber eines behinderten Tieres auch mit einem erheblichen Pflegeaufwand zu kämpfen haben. In den letzten Jahrzehnten wuchs jedoch der Stellenwert der Haustiere zunehmend und damit auch die Erwartungshaltung von Tierbesitzern bezüglich der medizinischen Versorgung ihrer Haustiere nach humanmedizinischem Standard. Das Interesse an therapeutischen und palliativen Maßnahmen nach Rückenmarksschädigungen rückt immer weiter in den Mittelpunkt, so dass hieran intensiv geforscht wird.

Unter anderem werden Zelltransplantationen vorgenommen, um die Nervenregeneration zu fördern (Nishida et al. 2011; Granger et al. 2012) und Laser-Therapien getestet (Draper et al. 2012). In der Humanmedizin wird bereits seit längerem an Nervenwurzelstimulatoren gearbeitet, um die neurourologische Rehabilitation anzuregen bzw. eine Blasenentleerung auf Knopfdruck zu ermöglichen (Grunewald et al. 1998). Mittlerweile ist der Erfolg einer solchen Implantation auch in einer Studie mit querschnittsgelähmten Hunden nachgewiesen worden (Granger et al. 2013). Die manuelle Blasenentleerung entfällt hiermit und Überlaufinkontinenzen können vermieden werden. Zu den medizinischen Fortschritten kommt ein reichliches Angebot an Hilfsmitteln im Alltag, wie maßgeschneiderte „Hunderollstühle“, Tragehilfen und Rampen, die es ermöglichen den Haustieren ein großes Stück Lebensqualität zurückzugeben.

Im Rahmen der humanmedizinischen Forschung konnte eine gesteigerte Knochenbildungsneigung nach neurologischen Verletzungen bzw. heterotope Ossifikationen in diversen Tiermodellen induziert werden (Michelsson et al. 1994; Klein et al. 1999; Salisbury et al. 2011). Obwohl bisher in der Tiermedizin keine Fälle beschrieben sind, könnte die Problematik der gesteigerten Knochenbildung nach neurologischen Läsionen daher mit steigender Anzahl paraplegischer Hunde in Zukunft auch hier anzutreffen sein. Aus diesem Grunde wäre eine Studie interessant, die sich damit beschäftigt, ob und in wie vielen Fällen eine veränderte Knochenbildung in paraplegischen Tieren auftritt.

2.3 Tiermodelle

2.3.1 Knochen- / Frakturheilung

Knochenheilungsstudien werden in den meisten Fällen mit Nagern durchgeführt. Unter den langen Röhrenknochen sind die vorherrschenden Untersuchungsobjekte Femur und Tibia, die in der Regel mit diaphysären Knochendefekten versehen werden. Beim Erzeugen eines Knochendefekts wird zwischen einer echten Fraktur und einer Osteotomie unterschieden. *Frakturen* können manuell oder mit Hilfe verschiedener Geräte, wie Guillotinen, Schlaggeräte oder 3-Punkt-Biegegeräte, erzeugt werden. Mit einem geschlossenen Frakturmodell kann das Frakturhämatom und der Einfluss des umliegenden Gewebes untersucht werden. Offene

Modelle erlauben eine präzisere Positionierung der Bruchstelle. Im Vergleich zur echten Fraktur gelingt mit der *Osteotomie* eine höhere Standardisierung des Knochendefekts. Dieser wird mit Hilfe von Sägedraht, oszillierender Säge oder Bohrer erstellt. Auf diese Weise kann der Defektspace je nach Fragestellung in der Größe variiert werden (Mills and Simpson 2012).

Die Stabilität einer Fraktur spielt bei der Heilung eine entscheidende Rolle. Daher ist es bei einem Frakturmodell von großer Bedeutung biomechanische Bedingungen zu standardisieren. Mit den heutzutage verfügbaren Techniken (Histing et al. 2011) ist es möglich, verschiedene Grade an Stabilität zu erzeugen, so dass entsprechend der Fragestellung überwiegend desmale oder eher enchondrale Ossifikation im Defektbereich hervorgerufen werden kann.

Marknägel werden in das Knochenmark vorgeschoben und verhindern das Verrutschen der Frakturenenden. Sie können bei geschlossenen Frakturen angewendet und ohne großen Aufwand positioniert werden. Die erreichte Stabilität hingegen ist gering, da Rotationsbewegungen möglich sind, und es besteht das Risiko einer Dislokation der Bruchenden. Der Verriegelungsnagel ist ein Marknagel mit proximalem Einschraubgewinde. Er wird in der Markhöhle befestigt und mit Hilfe von Verriegelungspins zusätzlich an der Kortikalis fixiert. So werden zusätzlich Rotationsbewegungen verhindert.

Die intramedulläre *Kompressionsschraube* besteht aus einem kegelförmigen, distalen Ende und einem proximalen Einschraubgewinde. Mit ihr ist es möglich, Druck auf den Frakturspace auszuüben.

Eine Osteosynthese mit Hilfe von *Platten und Schrauben* ermöglicht eine starre Fixierung, schon dabei die Knochenmarkshöhle und vermeidet eine Manipulation im Defektbereich. Nach Befestigung des Implantats wird ein Knochenstück entfernt, so dass ein Defektspace standardisierter Größe entsteht. Nachteilig sind die hohen Kosten für die Materialien und die Komplexität des operativen Eingriffs.

Die Stabilität mit einem *Fixateur externe* ist beliebig und auch nach dem operativen Eingriff noch veränderbar. Er besteht aus Pins, die im Knochen befestigt werden und einem externen Element, das diese untereinander verbindet. Mit dieser Methode erhält man die Vorteile einer internen Platte und ermöglicht eine unkomplizierte Entfernung der Materialien. Allerdings ist sie teuer, erfordert einen komplexen Eingriff und beinhaltet das Risiko einer Infektion.

2.3.2 Rückenmarksverletzungen

Modelle für Rückenmarksverletzungen

Die verschiedenen Modelle zur Untersuchung von spinalen Verletzungen reichen von leichten, stumpfen Traumata über Kompressionen bis zur scharfen Durchtrennung des Rückenmarks. Vollständige oder partielle Durchtrennungen des Rückenmarks werden kontrovers diskutiert, da sie es nicht ermöglichen, die in der Humanmedizin üblichen Verletzungen widerzuspiegeln. Auf diese Weise kann jedoch die axonale Regeneration untersucht werden (Kobayashi et al. 1997). Modelle der stumpfen Läsionen sind hierfür weniger geeignet, schaffen jedoch eine pathophysiologische Umgebung, die den Umständen in der Humanmedizin näher kommt (Kwon et al. 2002).

Die gängigsten Methoden stumpfer Verletzungen sind Kontusionsmodelle mit Hilfe des New York University Impactors (NYUI) oder des Ohio State University Impactors (OSUI). Kompressionsmodelle werden üblicherweise mit Hilfe von Ballondilatation oder einer modifizierten Aneurysmaklemme durchgeführt.

Der NYUI (Gruner 1992) verursacht die Kontusion durch ein 10 g schweres, herabfallendes Gewicht, das auf die dorsale Fläche des Rückenmarks auftrifft. Mit zunehmender Höhe (6,25 mm; 12,5 mm; 25 mm und 50 mm) verstärkt sich die verursachte Läsion. Das Gerät ist unter anderem in der Lage, die Aufprallgeschwindigkeit und das Ausmaß der Gewebekompression zu erfassen.

Die computergesteuerte Kontusion des OSUI (Stokes 1992) erfolgt nicht auf Basis der Schwerkraft, sondern mit Hilfe eines mechanisch beschleunigten, senkrecht orientierten Stabs. Dieser verursacht einen Aufprall mit einer beliebigen, voreingestellten Kraft auf die dorsale Fläche des Rückenmarks. Hierfür wird das Tier an den Wirbelfortsätzen kranial und kaudal eines laminektomierten Wirbels fixiert, die Impactorspitze in Startposition gebracht und die gewünschte Kraft eingestellt. Der herabschnellende Stab drückt das Gewebe zusammen und verweilt auf seinem tiefsten Punkt 4 – 5 ms, bevor er aktiv zurückgezogen wird. Einwirkende Kraft, Tiefe der Gewebekompression und Zeit werden gemessen und in Verlaufskurven dargestellt.

Versuche der Rückenmarkskompression mit Hilfe von Ballondilatation wurden bereits vor Jahrzehnten bei verschiedenen Tierarten durchgeführt (Tarlov et al. 1953; Martin and Bloedel 1973; Tator and Deecke 1973; Eidelberg et al. 1976; Khan and Griebel 1983). Keine der Methoden konnte jedoch eine reproduzierbare und standardisierte neurologische Schädigung in verschiedenen Abstufungen erzeugen. Vanický et al. (2001) gelang dies mit Hilfe eines epidural eingeführten French-Fogarty-Katheters. Dieser wird mit 10, 15 oder 20 µl Salzlösung befüllt und komprimiert so über 5 min das Rückenmark. Eine auf diese Art und Weise verursachte Läsion wird aufgrund der entstehenden Ischämie neben mechanischen auch durch vaskuläre Faktoren beeinflusst.

Mit dem gleichen Mechanismus wird die neurologische Schädigung durch eine modifizierte Aneurysmaklemme hervorgerufen (Rivlin and Tator 1978). Die Klemme wird um das Rückenmark gelegt und komprimiert das Gewebe. Die erwünschte Abstufung der neurologischen Schäden ist durch Dauer und Stärke der Kompression (2 – 98 g) beeinflussbar.

Beurteilung neurologischer Schäden

Die Beurteilung neurologischer Schäden im Tiermodell und deren Regeneration können auf verschiedene Weise vorgenommen werden. Sie beinhaltet in der Regel eine anatomische und eine funktionelle Auswertung. Mit Hilfe der Histologie und Immunhistochemie werden anatomische Gegebenheiten dargestellt. Um den funktionellen Zustand bzw. die funktionelle Genesung einzuordnen, wird der physiologische Bewegungsablauf beurteilt. Eine weit verbreitete Methode hierfür ist ein 1995 eingeführter Bewertungsmaßstab der Fortbewegung – der BBB-Score (Basso Beattie Brasnahan locomotor rating scale) (Basso et al. 1995). Die physiologische Ausführung der Bewegungsabläufe, einschließlich Bewegungsradius und Bewegungsintensität einzelner Gelenke sowie das Gehen, werden beobachtet und in ein Punktesystem eingeordnet (siehe 9.2). 21 Punkte entsprechen einem gänzlich unauffälligem Gangbild, 0 Punkte einer vollständigen Paraplegie.

Eine ganze Reihe anderer Analysen können ebenfalls Auskunft über den neurologischen Zustand geben. Bei dem „grid walking test“ müssen die Tiere einen Gang mit Stäben variierenden Abstands zueinander durchqueren. Dabei werden die Fehlritte zwischen die Stäbe gezählt (Soblosky et al. 1997). Andere Tests messen die Zeit, die sich die Tiere auf einer rotierenden Trommel (Whishaw et al. 2008), auf einem 1,5 cm schmalen, hölzernen Balken (Hicks and D'Amato 1975) oder einer zunehmend kippenden Platte halten können (Rivlin and

Tator 1977). Diese Untersuchungen sind jedoch nur bei geringfügigen, neurologischen Einschränkungen einsetzbar, nicht aber bei vollständigen Paraplegien.

Ein zusätzliches Augenmerk sollte, neben dem Gangbild, auch auf das vegetative Nervensystem (Darm- / Blasenfunktion) und auf das sensorische System (Schmerzzustände) gelegt werden (Kwon et al. 2002).

2.4 Vorausgegangene Studie

In einer vorausgegangenen Studie der Arbeitsgruppe wurde der Einfluss eines Rückenmarktraumas auf die Knochenbildung im Rattenmodell untersucht. Hierfür wurde ein Osteosynthesemodell an Femur und Humerus etabliert und jeweils ein Knochenstück standardisierter Größe entnommen. So sollten mögliche Unterschiede der Defektheilung zwischen den Gruppen mit und ohne Paraplegie ermittelt werden. Es handelte sich um das gleiche Modell, das auch in dieser Studie verwendet wurde. Insgesamt gab es sieben Gruppen mit jeweils 10 Tieren (siehe Tabelle 1), bei denen Daten zu zwei Standzeitpunkten erhoben wurden (14 und 28 Tagen). Als Modell der Rückenmarksverletzung kam hierbei der Ballonkatheter nach Vanický et al. zum Einsatz (siehe 2.3.2).

Tiere der Gruppe I wurden einer Rückenmarkskontusion im midthorakalen Bereich (ASCI; Acute Spinal Cord Injury) und einer Osteotomie am rechten Femur unterzogen. Als Hypothese wurde die Assoziation von ASCI mit einem erhöhten Knochenvolumen definiert. Eine weitere zu klärende Frage war, ob die gesteigerte Knochenbildung lediglich kaudal des Querschnittsniveau auftritt oder auch kranial davon auszulösen ist. Bei Tieren der Gruppe II wurde daher eine Osteotomie am linken Humerus durchgeführt, um die Defektheilung auch kranial der Kontusion beurteilen zu können. Die Gruppen III und IV fungierten als Kontrolle. Zuletzt sollte der Einfluss einer lokalen, im Vergleich zu einer zentralen Nervenschädigung dargestellt werden. Hierfür bekamen Tiere zusätzlich zu einem Eingriff am Femur, statt einer Rückenmarksverletzung, eine Läsion des N. ischiadicus (Gruppe V). Die gebildeten Knochenvolumina wurden in den genannten Gruppen nach 14 Tagen untersucht. Um einen Zeitverlauf der femoralen Defektheilung zu erhalten, erfolgte eine zusätzliche Beurteilung nach 28 Tagen (Gruppen VI + VII; Tab. 1).

Tabelle 1: Versuchsgruppen der Vorstudie

Gruppe	Eingriff	Standzeit
I	ASCI, Femurosteosynthese	14 d
II	ASCI, Humerusosteosynthese	14 d
III	Kontrolle, Femurosteosynthese	14 d
IV	Kontrolle, Humerusosteosynthese	14 d
V	Femurosteosynthese, Läsion des N. ischiadicus	14 d
VI	ASCI, Femurosteosynthese	28 d
VII	Kontrolle, Femurosteosynthese	28 d

In einer zweidimensionalen Auswertung mit Hilfe von Röntgenbildern konnte nach 14 Tagen, sowohl periostal als auch im Defektspace selbst, Knochen häufiger in der ASCI-Gruppe (Gruppe I) nachgewiesen werden. Hier zeigten 90 % der Tiere eine Knochenformation im Defektspace und 30 % im periostalen Bereich. Hingegen konnte in der Kontrollgruppe (III) nur 71,4 % im Defektspace und 0 % periostal nachgewiesen werden.

Diese Erkenntnisse zeigen sich auch in der dreidimensionalen Auswertung der Mikro-CT-Scans (Abb. 3). Es wurde jeweils nach 14 Tagen signifikant mehr Knochenvolumen in den Gruppen mit Rückenmarksläsion gebildet als in den Kontrollgruppen. Dies war sowohl am Femur als auch am Humerus der Fall. Tiere mit Ischiadikusläsion bildeten noch mehr Knochen als solche mit zentralen Nervenverletzungen. Nach 28 Tagen waren diese Unterschiede zwischen ASCI- und Kontrolltieren nicht mehr nachweisbar.

Histologisch waren, im Vergleich zu den Kontrollgruppen, bei den Tieren mit zentraler oder lokaler Nervenschädigung deutlicher ausgeprägte periostale Ossifikationen vorhanden. Bei allen Tieren lief die Knochenbildung über enchondrale Ossifikation ab, sowohl im endostalen wie auch im periostalen Bereich.

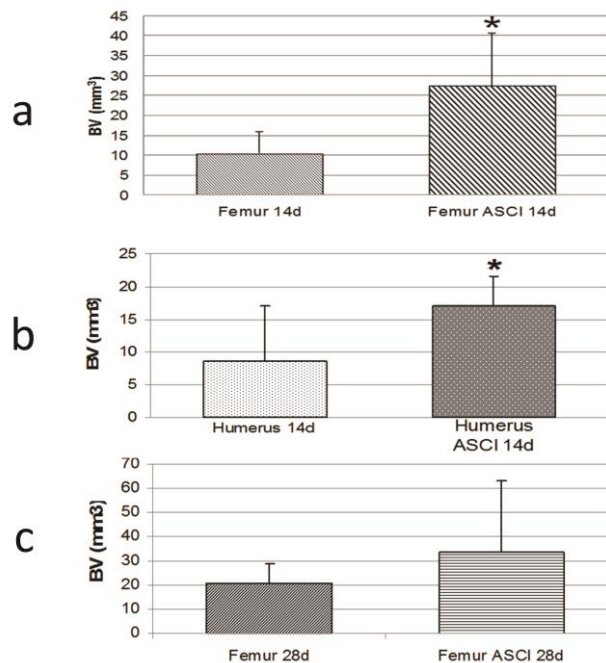


Abbildung 3: Ergebnisse der Vorstudie

Knochenvolumen im Defektspace (Mittelwerte \pm Standardabweichung, BV = Bone Volume) in mm³; Vergleich Kontrolle und ASCI (Acute Spinal Cord Injury = akutes Rückenmarkstrauma) 14 Tage nach Femurosteotomie (a), 14 Tage nach Humerusosteotomie (b) und 28 Tage nach Femurosteotomie (c) (* = $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe) (aus Promotionsarbeit „Frakturheilung bei Paraplegie im Rattenmodell“ von J. Holschbach Tierärztliche Hochschule Hannover, bislang nicht publiziert).

2.5 Zielsetzung

Die Ergebnisse der Vorstudie haben gezeigt, dass der in der Klinik beobachtete Effekt einer gesteigerten Knochenbildung bei zentraler Nervenschädigung auch im Tiermodell vorhanden und reproduzierbar ist. Demnach schien das Modell für genauere Untersuchungen der Pathogenesemechanismen geeignet zu sein.

Nach 14 Tagen konnte eine signifikant erhöhte Kallusbildung am Femur bei der Gruppe mit Rückenmarksverletzung nachgewiesen werden. Das lässt auf einen Osteogenese-stimulierenden Effekt einer zentralen Nervenläsion schließen. Da diese Unterschiede im Knochenvolumen nach 28 Tagen nicht mehr signifikant waren, scheint nur die frühe Phase der Knochenheilung verändert zu sein und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen werden.

Ob lokale oder systemische Faktoren für die Veränderungen verantwortlich sind, konnte nicht abschließend festgestellt werden. Das Kallusvolumen ist bei lokaler Nervenschädigung des N. ischiadicus größer als bei zentraler Schädigung. Das könnte für einen lokalen Mechanismus sprechen. Allerdings wurde bei Rückenmarkskontusion sowohl am Femur als auch am Humerus ein signifikant erhöhtes Kallusvolumen gefunden, weshalb ein systemischer Mechanismus nicht ausgeschlossen werden kann.

In der Literatur ist man sich uneinig, wodurch die größere Kallusmasse verursacht wird. Ist sie durch eine Beeinflussung der Auf- und Abbauvorgänge des Knochens bedingt oder kommt der vergrößerte Kallus durch eine zufällig im Frakturbereich auftretende, lokale Bildung einer HO zustande? Kontrolltiere zeigten in der Vorstudie keine periostalen Ossifikationen, sondern bildeten Knochen nur im Defektspace. Bei den Tieren mit RMV waren diese aber durchaus vorhanden, was ein Hinweis auf die Entwicklung lokaler HOs darstellen könnte.

Da Veränderungen in der Knochenbildung lediglich nach 14 Tagen sichtbar waren, sollte die jetzige Studie Ursachen aufdecken, die sich möglicherweise in der frühen Phase der Frakturheilung (nach 3, 7 und 14 Tagen) manifestieren. Wichtige Vorgänge während dieser frühen Phase stellen die Initiierung der entzündlichen Reaktion auf die Verletzung und die Bildung neuer Gefäße dar. Durch eine gesteigerte inflammatorische Antwort des Organismus auf die Fraktur könnten die einzelnen Heilungsphasen vorangetrieben werden und zu einer früheren Bildung von Knochengewebe führen. Aus diesem Grunde wurde die Einwanderung von Makrophagen als die wichtigsten beteiligten Entzündungszellen, durch Ermittlung des prozentualen Anteils von CD68-positiven Zellen im Defektspace, ermittelt. Außerdem wurde die Angiogenese untersucht. Bekanntlich führt ein niedriger Sauerstoffdruck vermehrt zu Bildung von Knorpelgewebe. Umgekehrt könnte durch eine bessere Sauerstoffversorgung, aufgrund von erhöhter Bildungsgeschwindigkeit bzw. einer größeren Menge an Gefäßen im Defektspace, eine höhere Tendenz zur Knochenbildung erreicht werden. Um eine solche Abweichung der Gefäßversorgung im Defektbereich zu untersuchen, wurden nach Kontrastmittelperfusion mit Hilfe eines Mikro-CTs die Gefäßvolumina (VV, Vessel Volume) sowie die Gefäßoberflächen (VS, Vessel Surface) im Defektspace berechnet. Nach Anfertigung einer HE-Färbung konnte die Anzahl der neugebildeten Gefäße pro mm² Defektspace auch histologisch erfasst werden. Zusätzlich könnte als wichtigster Angiogenesefaktor eine Erhöhung der VEGF-Menge diese Hypothese bestärken, weshalb die Plasmakonzentration mit Hilfe von *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays* (ELISAs) bestimmt wurde. Ebenso wurden BALP-Konzentrationen als Indikator für Knochenneubildung ermittelt.

3. Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Insgesamt wurden 33 Tiere im Alter von drei bis sechs Monaten in sechs Gruppen eingeteilt (Tab. 2). Bei Tieren der Gruppe A wurde eine Femurosteotomie und eine Rückenmarkskontusion durchgeführt (ASCI = Acute Spinal Cord Injury; in Diagrammen des Ergebnisteils als „Paraplegie“ bezeichnet). Tiere der Gruppe K fungierten als Kontrollgruppe und wurden neben der Osteotomie lediglich einer Sham-OP unterzogen (in Diagrammen als „Kontrolle“ bezeichnet).

Tabelle 2: Versuchsgruppen der vorliegenden Studie

Gruppe	Anzahl	Eingriff	Standzeit
A1	n = 6	ASCI + Femurosteotomie	3 d
A2	n = 5	ASCI + Femurosteotomie	7 d
A3	n = 6	ASCI + Femurosteotomie	14 d
K1	n = 5	Sham-OP + Femurosteotomie	3 d
K2	n = 5	Sham-OP + Femurosteotomie	7 d
K3	n = 6	Sham-OP + Femurosteotomie	14 d

3.2 Versuchstiere und Tierhaltung

Der Versuch wurde mit weiblichen Sprague-Dawley (SD) Ratten durchgeführt. Zwei Wochen vor Versuchsbeginn wurden sie mit einer Gruppengröße von max. 4 Tieren eingestallt und im Tierhaus der Orthopädischen Universitätsklinik Heidelberg unter konventionellen Bedingungen, bei einer Temperatur von 19°C bis 23°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 bis 70 % und einem automatischen Beleuchtungsprogramm mit 12-stündigem Hell-

Dunkel-Rhythmus in Makrolonkäfigen Typ IV gehalten. Der Zugang zu pelletiertem Futter (Ssniff® R/M-H) und Trinkwasser aus Tränkeflaschen war jederzeit gegeben, während Babygrießbrei nur in den ersten Tagen *post operationem* angeboten wurde. Zum Zeitpunkt der operativen Eingriffe betrug das Körpergewicht zwischen 250 und 360 g. Alle tierexperimentellen Eingriffe wurden durch das Regierungspräsidium Karlsruhe genehmigt (Aktenzeichen 35-9185.81 / G 234/10) und in der Universitätsklinik Heidelberg, Department für Orthopädie, Unfallchirurgie und Paraplegiologie, unter Beachtung des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

3.3 Tierexperimente

3.3.1 Narkose und präoperative Vorbereitung

Für die operativen Eingriffe wurde den Tieren eine vollständig antagonisierbare Injektionsnarkose intraperitoneal verabreicht. Hierbei handelt es sich um eine Kombination von Fentanyl, Medetomidin und Midazolam, deren Wirkung nach erfolgter Operation durch Naloxon, Atipamezol und Flumazenil vollständig antagonisiert werden kann (Tab. 3). Aufgrund der Operationsdauer wurde nach maximal 45 min eine erneute Narkoseinjektion intramuskulär appliziert.

Tabelle 3: Dosierung Anästhesie und Antidot

Narkose	Dosierung (μg / kg KG)	Antidot	Dosierung (μg / kg KG)
Fentanyl	5	Naloxon	120
Medetomidin	150	Atipamezol	750
Midazolam	2000	Flumazenil	200

Nach Einleitung der Narkose wurde die rektale Körpertemperatur mit Hilfe eines digitalen Thermometers kontinuierlich überwacht und eine narkosebedingte Hypothermie durch Lagerung auf einer Wärmeplatte mit einer Regelgenauigkeit von $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ verhindert. Den Tieren wurde Augensalbe und eine körperwarme, subkutane Glukoseinfusion von 1,5 ml appliziert. Die Operationsgebiete an der rechten Hinterextremität und im dorsalen midthorakalen Bereich wurden geschoren, mit PVP-Lösung gewaschen und mit Povidon-Iod desinfiziert. Es folgte eine sterile Abdeckung des Tieres und eine erneute Desinfektion des Operationsfeldes.

3.3.2 Femurosteotomie und -osteosynthese

Der Zugang erfolgte lateral, mittels eines ca. 3 cm langen Hautschnittes, am rechten Oberschenkel (Abb. 4 a). Um das Femur freizulegen, wurde die Fascia lata am kranialen Rand des M. biceps femoris inzidiert und der M. biceps femoris nach kaudal sowie der M. vastus lateralis nach kranial gezogen. Die freigelegte Diaphyse wurde von allen muskulären Ansatzpunkten befreit und die Osteosynthese mit Hilfe von Platten und Schrauben durchgeführt (Abb. 4 b - d). Die verwendeten Materialien sind speziell für das experimentelle Arbeiten mit Ratten angefertigt (Ratfix ®, AO Development Institute, Davos). Die Platten bestehen aus Polyetheretherketon (PEEK), einem thermoplastischen Kunststoff (Abb. 4 c – rechts oben). Sie enthalten acht Löcher und verfügen über Abmessungen von 23 mm x 3 mm x 2 mm. Mit Hilfe von sechs Titanschrauben wurden sie winkelstabil am Femur befestigt, sodass jeweils das innerste Loch der Platte frei blieb. Die Schrauben haben eine Länge von 6,5 mm, einen Durchmesser von 0,7 mm und eine vorgegebene Sollbruchstelle. Mit dem hinteren Teil werden sie in dafür angefertigte Schraubendreher befestigt (Abb. 4 c - links) und danach in den Knochen eingebracht. Durch Aufsetzen der Sägelehre auf die Platte (Abb. 4 e, Abb. 4 c – rechts unten) konnte das Entfernen eines Knochenstücks standardisierter Größe (2 mm Länge) gewährleistet werden. Dies erfolgte bei gleichzeitiger Kühlung durch Natriumchlorid (NaCl) mittels eines Sägedrahtes von 0,22 mm Durchmesser (Abb. 4 f). Danach wurde die Muskulatur mit Einzelheften adaptiert, die Hautnaht durch subkutane Hefte entlastet und die Haut mit Kreuzhefte verschlossen.

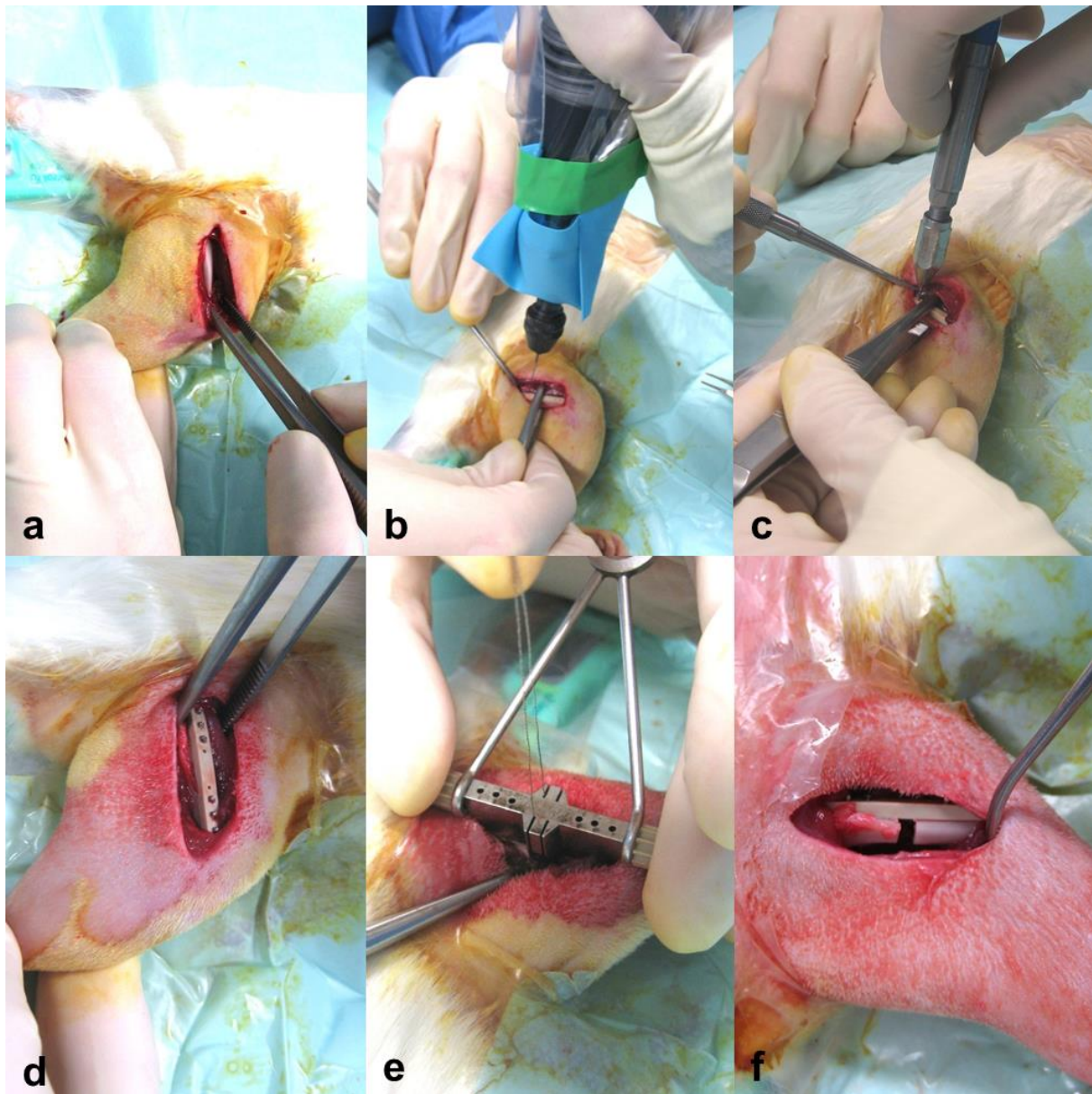


Abbildung 4: Operation Femurosteotomie

Hautschnitt und Femurpräparation (a); Befestigung der PEEK-Platte am Knochen durch Vorbohren der Löcher (b) und Implantieren der Schrauben (c); vollständige Fixierung der winkelstabilen Platte (d), Erzeugen des Knochendefektes standardisierter Größe mit Hilfe von Sägelehre und Sägedraht (e); Femur nach Entnahme des 2 mm großen Knochenstückes (f).

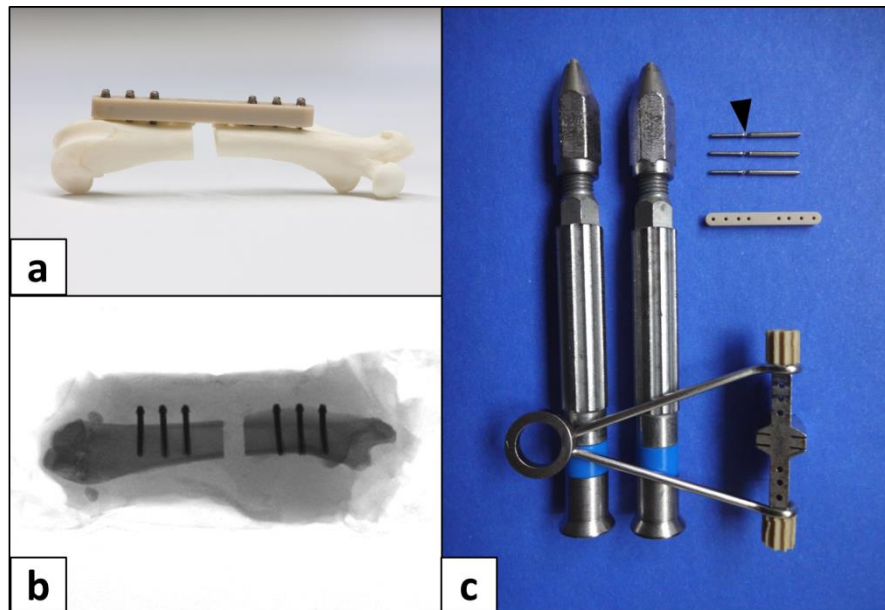


Abbildung 5: Osteotomiemodell und Instrumente

Osteotomiemodell nach Plattenosteosynthese mit PEEK-Platte, 6 Titanschrauben und 2 mm breitem Knochendefekt (a); Scout Scan (= Röntgenaufnahme im Mikro-CT) von entnommenem Femur nach Euthanasie – aufgrund der Röntgendurchlässigkeit der PEEK-Platte sind lediglich Schrauben, Knochen und umliegendes Gewebe zu erkennen (b); verwendete spezielle Instrumente für die Femurosteosynthese – links: 2 Schraubendreher zum Einbringen der Schrauben, rechts oben: 8-Loch-Platte und Schrauben mit erkennbarer Sollbruchstelle (Pfeilspitze), rechts unten: Sägelehre zum Aufsetzen auf die Platte und Entfernen eines 2 mm breiten Knochenstückes.

3.3.3 Laminektomie und Kontusion

Im dorsalen, midthorakalen Bereich wurde der Hautschnitt für den Zugang der Laminektomie gesetzt. Nach Präparation der thorakalen Wirbel 8 bis 10 (Th 8 bis Th 10) wurden bei Th 9 Dornfortsatz und Wirbelbogen entfernt. Auf diese Weise wurde das Rückenmark in diesem Bereich freigelegt (Abb. 6 a). Bei den Tieren der Kontrollgruppe folgte danach der mehrschichtige Wundverschluss wie unter 3.3.2 beschrieben, während Tiere der ASCI-Gruppe für die Rückenmarkskontusion vorbereitet wurden. Um eine einheitliche Verletzung zu induzieren, wurde die Kontusion mit einem IH-(Infinite Horizon)-0400 Impactor durchgeführt (Abb. 7 a + b). Hierfür wurden die Tiere unter den Metallstab des Impactors positioniert und an den Dornfortsätzen Th 8 und Th 10 mit Hilfe von Adson-Pinzetten so fixiert, dass sich der Brustkorb leicht von der Unterlage abhob (Abb. 6 b). Mit der Impactorspitze kann maschinell eine voreingestellte Kraft auf das Rückenmark ausgeübt werden. Bei einer Kraft von

200 kDyn wird eine inkomplette Paraplegie verursacht, die sich nach einigen Tagen zu regenerieren beginnt (Scheff et al. 2003). Für Ratten wird eine Impactorspitze mit einem Durchmesser von 2,5 mm verwendet. Nach Erzeugen der Kontusion fand eine genaue Atmungsüberwachung bis zum Ende der Narkose statt, ggf. mit Doxapram-Injektion i.m. Auch dieses Operationsgebiet wurde mehrschichtig verschlossen (Wundverschluss siehe 3.3.2).

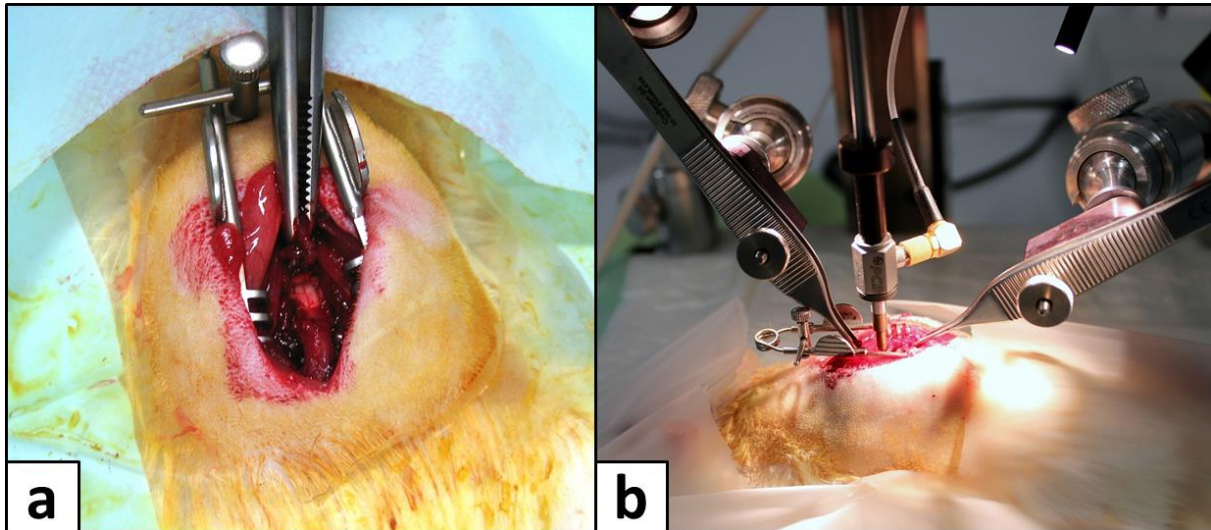


Abbildung 6: Operation Laminektomie und Rückenmarkskontusion

Zugang zum Rückenmark nach Präparation der midthorakalen Wirbel und Laminektomie des thorakalen Wirbels Th 9 (a); Vorbereitung der Kontusion mit einer Kraft von 200 kDyn durch einen IH-0400-Impactor – die Tiere wurden unter dem senkrecht ausgerichteten Stab positioniert und mit Hilfe der Adson-Pinzetten an den Dornfortsätzen Th 8 + Th 10 fixiert (b).

Anhand zweier, vom Gerät dargestellter Graphen kann überprüft werden, ob der Vorgang des Impacts wie gewünscht verlaufen ist.

Der „Displacement vs. Time“- Graph (Abb. 7 c) trägt die Eindringtiefe der Impactorspitze bis zum tiefsten Punkt ins Gewebe gegen die Zeit auf (Einheiten Mikrometer / Millisekunden). Er startet an dem Ausgangspunkt der Impactorspitze und verläuft bis zum Nullpunkt, was die höchste tatsächliche Eindringtiefe darstellt. Dann steigt die Kurve als Zeichen der Retraktion der Spitze wieder an bis diese zum ursprünglichen Ausgangspunkt zurückgekehrt ist. Die vertikale rote Linie lässt den Zeitpunkt erkennen, zu dem die Impactorspitze in das Gewebe eindringt. Die horizontale rote Linie zeigt die Eindringtiefe.

Der „Force vs. Time“- Graph (Abb. 7 d) stellt die Kraft dar, die durch den Sensor in der Impactorspitze über die Zeit gemessen wurde (Einheiten Kilodyn / Millisekunden). Diese Kurve besteht aus mehreren kleinen Wellen und einem größeren Peak. Erstere entstehen beim Beschleunigen und Zurückziehen der Spitze. Der große Peak entsteht durch den Aufprall auf das Gewebe.

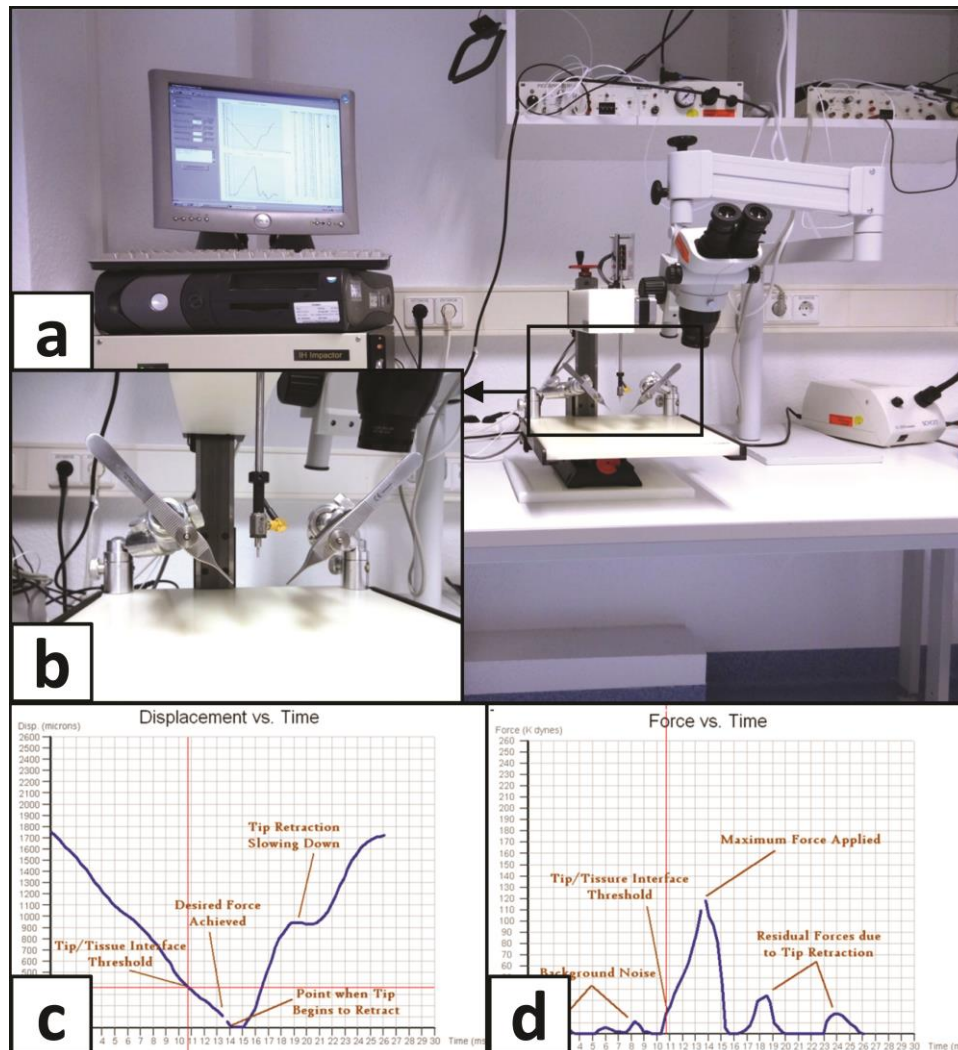


Abbildung 7: Geräte und Graphen der Rückenmarkskontusion

Arbeitsplatz für die Rückenmarkskontusion – bestehend aus einem PC, dem Impactor selbst und einem Mikroskop zur passenden Positionierung der Tiere und genauem Anpassen der Laminektomiegröße (a); Haltevorrichtung mit Adsonpinzetten und senkrecht ausgerichtetem Kontusionsstab (Durchmesser 2,5 mm), die Kontusion wird maschinell mit einer voreingestellten Kraft erzeugt (b); Graphen zur Kontrolle der korrekt abgelaufenen Kontusion (c + d) (User's Manual - IH Spinal cord impactor by Precision Systems & Instrumentation 6/2012 Version 5.0) – „Displacement vs. Time“ trägt die Eindringtiefe der Impactorspitze gegen die Zeit auf (c), „Force vs. Time“ stellt die gemessene tatsächlich ausgeübte Kraft über die Zeit dar (d).

3.3.4 Postoperative Versorgung

Das Eröffnen der eigenen Naht wurde durch prophylaktische Klammerung der OP-Wunde im femoralen Bereich verhindert. Zur Unterstützung der Wundheilung wurden beide Nähte mit Zinkoxid abgedeckt. Die Tiere bekamen eine subkutane Injektion Gentamycinsulfat (2,6 mg / kg KG), eine körperwarmer Infusion mit NaCl und das Antidot (siehe 3.3.1). Innerhalb von 5 min war die Narkosewirkung aufgehoben und die Tiere begannen mit der Nahrungsaufnahme.

Durch die Paraplegie ist die Fähigkeit der Tiere gleichzeitig auf den Hintergliedmaßen zu sitzen und die Vordergliedmaßen zum Fressen zu benutzen nicht mehr vorhanden. Um die Nahrungsaufnahme zu erleichtern, gleichzeitig aber eine standardisierte Fütterung zu gewährleisten, wurde den Tieren beider Gruppen in den ersten Tagen Grießbrei angeboten.

Schmerzmedikationen wurden ca. eine halbe Stunde nach Antidot-Injektion und in den folgenden Tagen zweimal täglich verabreicht (Buprenorphin s.c.: 0,02 bis 0,03 mg / kg KG). Außerdem musste die Blase bei paraplegischen Tieren *post operationem* ca. alle 8 h geleert werden bis aufgrund beginnender Nervenregeneration eine selbständige Miktion wieder möglich war. In den ersten Tagen wurde genauestens auf die Futter- und Wasseraufnahme der Tiere geachtet, gegebenenfalls musste zwangsgefüttert und infundiert werden. Außerdem erfolgte eine tägliche Kontrolle der Operationswunden, des Allgemeinbefindens und der Notwendigkeit einer Schmerzmedikation.

3.4 Erfolgskontrolle der Rückenmarkskontusion

Um die erfolgreiche und standardisierte Durchführung der Rückenmarkskontusion beurteilen zu können, wurden BBB-Scores bestimmt. Zudem sollten die gravierenden Folgen für das Gewebe anhand einer histologischen Untersuchung der Kontusionsstelle aufgezeigt werden.

3.4.1 BBB-Score

Um den Grad der Rückenmarkskontusion nach dem operativen Eingriff und den Regenerationsverlauf bis zum Ende der Standzeit beurteilen zu können, wurde bei den Tieren einen Tag *post operationem* und direkt vor Euthanasie der BBB-Score ermittelt. Mit dem Basso-Beattie-Bresnahan Score kann das Ausmaß der Nervenläsionen im Rückenmark eingeschätzt werden. Hierfür wird das Gangbild der Tiere beurteilt und dieses anhand von Gelenkbewegungen, Fußstellung und Belastung einem der 21 Stufen zugeordnet (siehe Anhang). Um auswertbare Videosequenzen zu erhalten, wurden die Tiere beim Durchqueren eines aus Plexiglas bestehenden Laufstegs gefilmt. Dieser machte ein genaues Betrachten der Fußstellung mittels eines im 45° Winkel unter dem Laufsteg platzierten Spiegels möglich (Abb. 8 a + b).

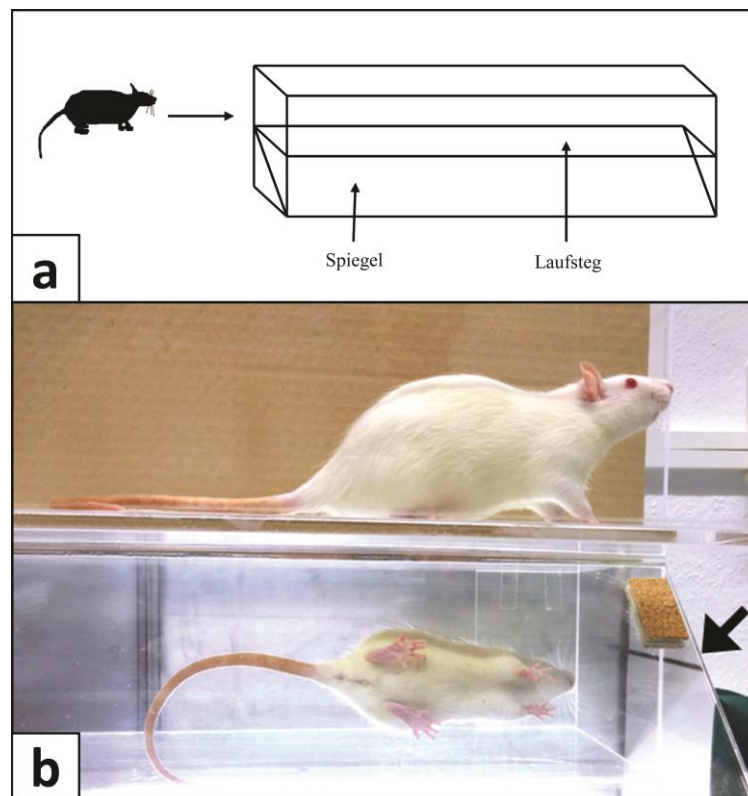


Abbildung 8: Auswertung der Neuroregeneration

Das Gangbild der operierten Tiere wurde mit Hilfe von Videosequenzen beim Durchqueren eines durchsichtigen Laufstegs mit darunter schräg positioniertem Spiegel aufgenommen und der BBB-Score bestimmt; Schema des Laufstegs (a); Kontrolltier im Laufsteg – Pfeil deutet auf Spiegel, genaue Fußstellung im Spiegel sichtbar (b).

3.4.2 Histologie des Rückenmarks

Mit einer histologischen Färbung des Rückenmarks aus dem midthorakalen Traumbereich wurde das Ausmaß der Kontusion dargestellt. Hierfür wurde in Kooperation mit Frau Viviana Grajales ein Tier nach 28 Tagen Standzeit euthanasiert und mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) perfundiert bevor das betroffene Rückenmarkgebiet entfernt wurde. Zur vollständigen Fixierung wurde das Gewebe weitere 24 h in PFA belassen und danach bis zur Anfertigung der Cryoschnitte in Succrose gelagert. Die angefertigten, sagittalen Cryoschnitte wurden auf Objektträger gezogen und eine Nissl-Färbung durchgeführt.

Hierbei wurden die Schnitte für 30 min in einem Chloroform-Ethanol-Gemisch (1:2) belassen, in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert (100 %, 95 %, 70 %, 50 % je 2 min), mit Aq. bidest 2 min gewaschen und danach 30 s in Thionin gefärbt. Es folgten zwei Waschschrte in Aq. bidest (2 min), die Entwässerung jeweils 2 min in aufsteigender Ethanolreihe und 3 x 5 min in Neoclear und das Eindecken der Schnitte mit Neomount.

3.5 Probenaufbereitung und -untersuchung

Um den Einfluss der Rückenmarkskontusion auf die Knochenheilung zu erfassen, wurde im Anschluss an die Euthanasie und Kontrastmittelperfusion eine Angiographie durchgeführt. Es folgten histologische, immunhistochemische und biochemische Untersuchungen (Abb. 9).

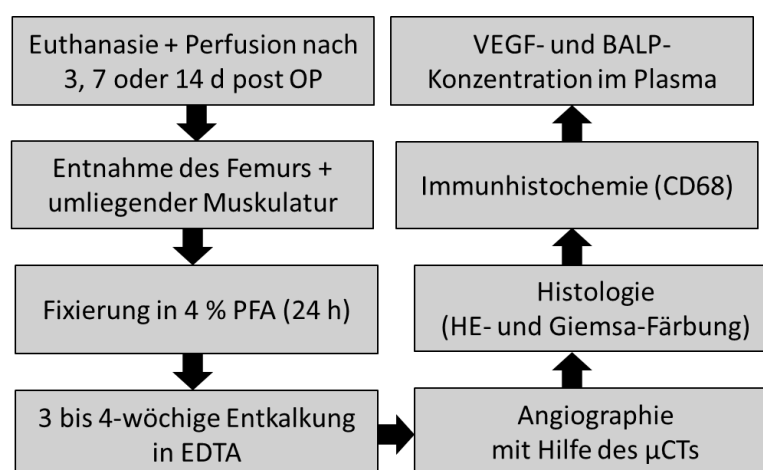


Abbildung 9: Schema Probenaufbereitung und Untersuchungen

3.5.1 Euthanasie und Perfusion

Um die Proben zu gewinnen, wurden die Tiere je nach Gruppenzugehörigkeit nach 3, 7 oder 14 Tagen euthanasiert. Die Blutabnahme zur Aufbereitung von Plasmaproben (siehe 3.5.5) und die Vorbereitung der Perfusion musste noch *in vivo* am narkotisierten Tier geschehen. Bei diesem Eingriff wurde eine Ketamin / Xylazin - Kombination als Narkose verwendet (Ketamin 100 mg / kg KG; Xylazin 5 mg / kg KG; intraperitoneal).

Zunächst wurde der Thorax eröffnet und der Zugang zum Herzen ermöglicht. Nach cardialer Entnahme wurden die Blutproben für 20 min bei 1800 Umdrehungen (entspricht 662 g) zentrifugiert und das Plasma bis zur späteren Verwendung bei -80°C gelagert. Um den Kreislauf aufrechtzuerhalten und eine Gerinnung vorzubeugen, wurde nach der Blutentnahme eine Volumensubstitution mit NaCl und Heparin durchgeführt. Durch die Entfernung der Haut an der Innenseite des Oberschenkels wurden die A. und V. iliaca externa sichtbar und der Perfusionsvorgang konnte unter Sichtkontrolle erfolgen (Abb. 10 a). Nach Eröffnen der Bauchhöhle und Präparation der Aorta abdominalis folgte das Legen einer Braunüle, die in die A. iliaca externa dextra vorgeschoben wurde (Abb. 10 b). Die Aorta und die V. cava wurden kranial der Braunüle abgeklemmt, ebenso die A. iliaca externa sinistra. Nach Eröffnung der V. cava im kaudalen Bereich wurde die Euthanasie durch Entnahme des Herzens abgeschlossen. Das Gefäßsystem des rechten Hinterlaufs wurde mit NaCl und Heparin gespült bis sich die aus der V. cava austretende Flüssigkeit klärte und keinerlei rötliche Schleier mehr aufwies (Abb. 10 c). Danach wurde das Bein mit dem kurz zuvor angemischten Röntgenkontrastmittel Microfil® (Flow Tech Inc, Massachusetts, USA) perfundiert. Bei erfolgreicher Perfusion färbten sich Gefäße und umliegendes Gewebe blau (Abb. 10 d). Microfil® ist ein Röntgenkontrastmittel, das zur Darstellung von Gefäßen in verschiedenen Farben und mit verschiedenen Eigenschaften erhältlich ist. Das hier verwendete blaue MV-120 behält nach Mischen der drei Komponenten für ca. 90 min eine flüssige Konsistenz. Um eine ausgehärtete, gummiartige Form zu erhalten, wurden die Tiere über Nacht bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wurde das gesamte Femur, einschließlich der umliegenden Muskulatur, durch Exartikulation am Hüft- und Kniegelenk entnommen und für 24 h in 4 % PFA fixiert.

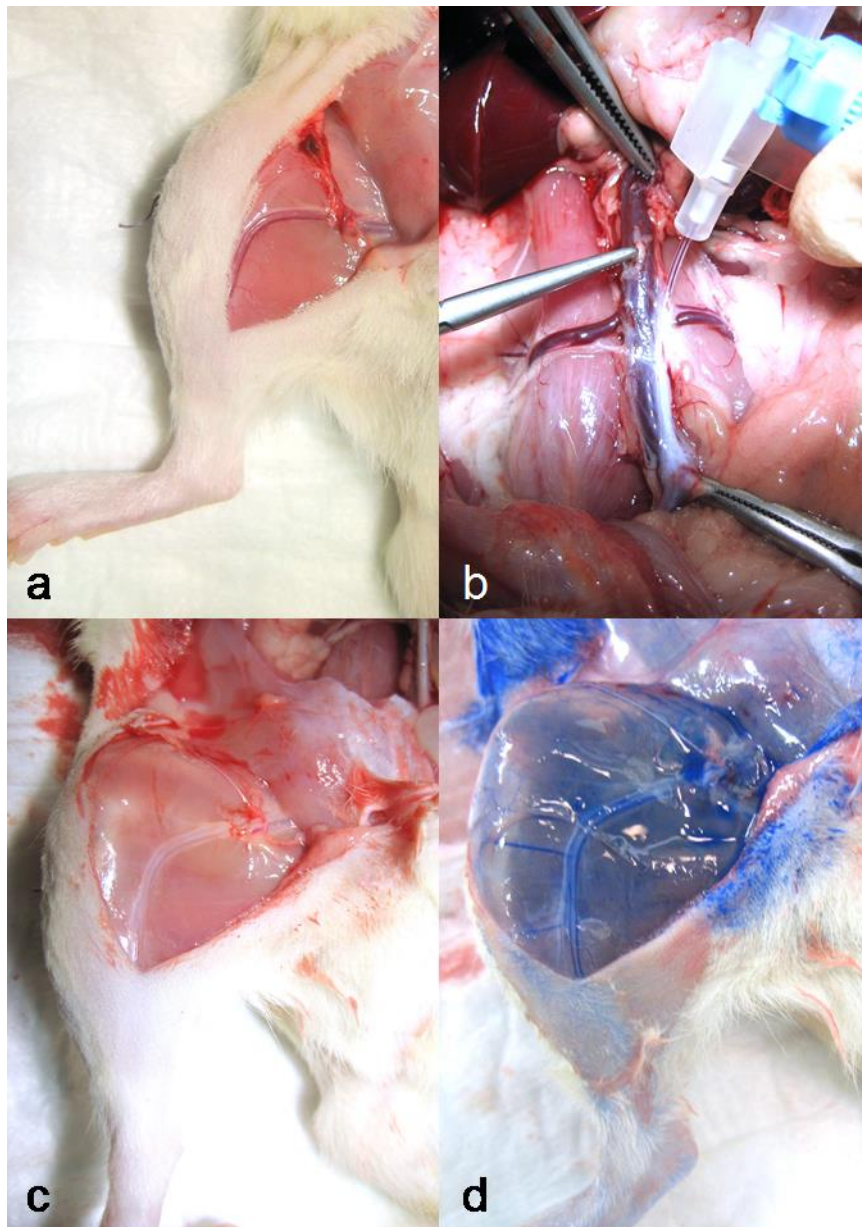


Abbildung 10: Perfusion

Freilegen der A. und V. iliaca externa dextra, um die Beurteilung einer erfolgreichen Perfusion zu ermöglichen – Gefäße sind aufgrund der Blutfüllung rot gefärbt (a); Schieben einer Braunüle von der Aorta abdominalis in die A. iliaca externa dextra (b); Spülen des Gefäßsystems mit heparinhaltiger NaCl-Lösung nach Eröffnen der V. cava – Gefäße sind blaß; (c); erfolgreiche Perfusion mit dem röntgendichten Kontrastmittel Microfil® - Gefäße und umliegendes Gewebe sind blau gefärbt (d).

3.5.2 Entkalkung

Die Entkalkung der Proben erfolgte im Anschluss an die PFA-Fixierung. Hierfür wurden sie für 3 x 15 min in Leitungswasser gewaschen und für die Dauer der Dekalzifizierung (21 bis 28 d) in Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) gegeben. Während dieser Zeit standen die Proben auf einem Laborschüttler. 3 x pro Woche wurde das EDTA gewechselt.

3.5.3 Mikro-CT-Analyse

Prinzip

Mittels herkömmlichen Röntgenaufnahmen ist es lediglich möglich ein 2-dimensionales Bild von einem Objekt zu erhalten. In einem solchen einzelnen Schattenbild gehen Tiefeninformationen durch Überlagerungen verloren. Bei einem Computertomographen dagegen, werden durch Anfertigung von Röntgenaufnahmen aus verschiedenen Richtungen Rohdaten gesammelt. Diese müssen mittels Rekonstruktion zu Transaxialschnitten des zu untersuchenden Objektes umgerechnet werden, um 3-dimensionale Informationen zu erhalten. Der kleinste Teil einer solchen Darstellung ist ein Voxel, was einem drei-dimensionalen Pixel gleichkommt. Konventionelle Geräte haben ein räumliches Auflösungsvermögen von 1 bis 2,5 mm (entspricht 1 – 10 mm³ Voxel). Ein Mikro-Computertomograph hingegen kann Bilder mit einer Auflösung von 9 µm erzeugen (Handbuch: Instruction Manual - SkyScan 1076).

Mikro-CT-Scans

Die Scans wurden mit einem SkyScan 1076 In vivo X-ray Mikro-Computertomograph angefertigt. Nach Dekalzifizierung (siehe 3.5.2) wurden die Proben dreimalig für 15 min in Leitungswasser gewaschen. Für die Dauer des Scans wurden sie in Frischhaltefolie gewickelt, um ein Austrocknen zu verhindern. Mit Hilfe eines Übersichtsröntgenbildes (Scout Scan) wurde der Scan-Bereich festgelegt. Dieser umfasste das gesamte Femur, einschließlich der umliegenden Muskulatur. Auf dem beweglichen Probentisch wurden die Proben in das Gerät gefahren und in einem 180° Radius insgesamt 656 Bilder angefertigt. Folgende Einstellungen wurden bei allen Scans verwendet: 9 µm Auflösung, 25 µm Titaniumfilter, 0,3° pro Rotationsschritt, 900 ms, 65 kV und 154 µA.

Rekonstruktion

Die durch die Röntgenbilder gewonnenen Daten werden durch die Rekonstruktion in transaxiale Schnittbilder umgewandelt. Rekonstruiert wurden die Proben in dem Bereich des Defektspalts zwischen den beiden innersten Schrauben. Der Knochen ist aufgrund der Entkalkung auf den Bildern nicht mehr darstellbar, ebenso die aus röntgenstrahlendurchlässigem Material bestehende Osteosyntheseplatte. Für die Analyse stellt das ein Problem dar, da anhand dieser Strukturen der Auswertungsbereich (ROI = Region of Interest) standardisiert platziert werden muss. Um dies trotz allem zu ermöglichen, wurden von jeder Probe zwei Rekonstruktionen generiert.

Die erste Rekonstruktion (Recon A, Abb. 11 a) wurde mit Einstellungen angefertigt, mit der die umliegende Muskulatur erkennbar wurde und bei der ein Hintergrundrauschen entstand (Threshold 0,006 – 0,026 / Smoothing 0 / Ring artefact reduction 5 / Beam hardening correction 100 / Defect pixel masking 15). Auf diese Weise wird die Platte als Lücke in der Muskulatur sichtbar und das ROI kann im folgenden Schritt der Analyse an der richtigen Stelle platziert werden (Abb. 11 c).

Die zweite Rekonstruktion (Recon B, Abb. 11 b) wurde mit Einstellungen angefertigt, die eine Darstellung von Microfil® ermöglichte, also für die eigentliche Auswertung der Gefäße nötig war (Threshold 0,013 – 0,026 / Smoothing 2 / Ring artefacts reduction 20 / Beam hardening correction 75 % / Defect pixel masking 12 %). Auf diese Rekonstruktion wurde im folgenden Schritt der Analyse das zuvor in Recon A platzierte und gespeicherte ROI gelegt.

Analyse

Die Auswertung erfolgte mit dem Analyseprogramm CTAn von SkyScan (CT-Analyser Version 1.10.9.0). Die zuvor rekonstruierten Daten lassen sich hier in transaxialen Schnittbildern darstellen. In aufeinanderfolgenden Schnittbildern der Probe wurde immer an der gleichen Stelle eine runde *Region of Interest* (ROI) platziert und ausgewertet. In der ersten Rekonstruktion (Recon A) wurden die ROIs so positioniert, dass sie die Platte an beiden Ecken schnitten (Abb. 11 c - Pfeile). Auf diese Weise konnte durch standardisierte Größe und Lage der Defektbereich plus eine gleichbleibende Menge angrenzender Muskulatur in die Auswertung einbezogen werden. Dieses in Recon A definierte und anhand von sichtbaren

Strukturen platzierte ROI wurde gespeichert und für Recon B übernommen, in der eine exakte Platzierung nicht möglich gewesen wäre.

Anhand von Probescans unentkalkter Femora konnte ermittelt werden, dass ein Durchmesser von mind. 5,0 mm nötig ist, um einen intakten Knochen komplett zu erfassen (Abb. 11 d). Der Durchmesser der ROIs betrug daher bei allen Auswertungen 5,2 mm.

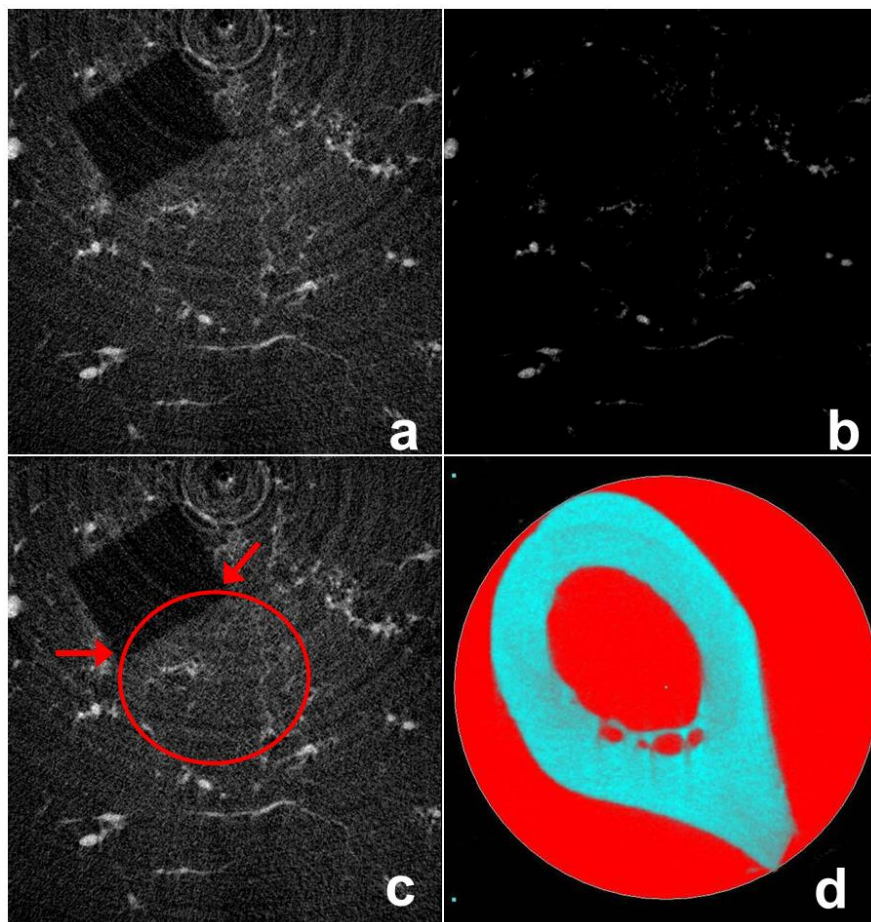


Abbildung 11: Mikro-CT-Analyse

Aus den Daten der Röntgenbilder wurden durch Rekonstruktion transaxiale Schnittbilder erzeugt. Rekonstruktion A wurde mit Einstellungen durchgeführt, die eine Lokalisation der Platte im Gewebe ermöglichte (a) – mit Hilfe dieser konnte im Folgenden die Positionierung des Auswertungsbereiches (= ROI; „Region of Interest“) standardisiert durchgeführt werden (c) – Pfeile deuten auf Schnittpunkt zwischen ROI und unteren Eckpunkten der Platte; Rekonstruktion B wurde mit Einstellungen durchgeführt, die eine optimale Auswertung des Microfils® ermöglichte (b); Ermittlung der passenden ROI-Größe anhand eines unentkalkten Rattenfemur – Durchmesser von 5,2 mm schließt das gesamte Femur ein (d).

Durch Aneinanderreihung der ROIs aller Schnittbilder einer Probe entsteht ein zylinderförmiges *Volume of Interest* (VOI) (Abb. 12). Die Abgrenzung des VOIs betrug insgesamt 4 mm (von Frakturmitte jeweils 2 mm nach proximal und distal). So wurde der 2 mm breite Defektpalt und jeweils 1 mm angrenzender Knochen in die Auswertung mit einbezogen. Daraufhin wurden die graustufigen Schnittbilder in schwarz-weiß umgewandelt (Threshold 40 – 255) und das Gefäßvolumen bzw. die Gefäßoberfläche berechnet (Tab. 4).

Tabelle 4: Parameter der Mikro-CT-Analyse

Berechnete Parameter der Gefäßneubildung im Defektpalt anhand
der mit Röntgenkontrastmittel perfundierten Hinterextremität

Berechnete Parameter		
VV	Vessel Volume	(mm ³)
VS	Vessel surface	(mm ²)

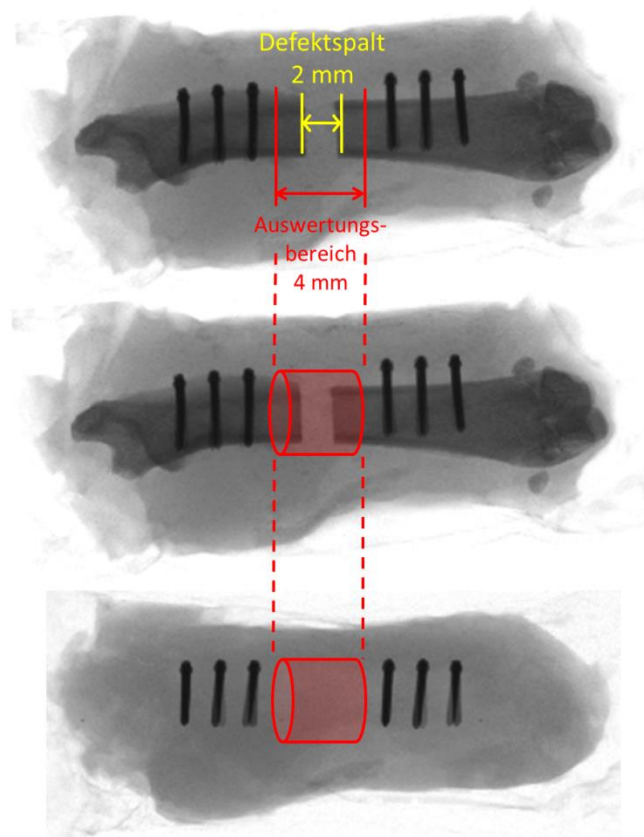


Abbildung 12: Übersichtsröntgenbild eines entnommenen Femurs

Scout Scan (= Röntgenaufnahme im Mikro-CT) eines Femurs mit umliegender Muskulatur zur Verdeutlichung des Auswertungsbereiches (VOI = Volume of interest) der Gefäßanalyse – ein VOI setzt sich aus allen aneinandergereihten ROIs (= Region of Interest) der einzelnen Schnittbilder zusammen; die Gefäße wurden zuvor mit Röntgenkontrastmittel gefüllt; Probe vor Entkalkung (24 h in 4 % PFA fixiert) (oben und Mitte) und nach 3 bis 4-wöchiger Entkalkung in EDTA (unten); im unentkalkten Zustand ist der Defektspalt zu erkennen, der zylinderförmige Auswertungsbereich umfasst den Defektspalt und jeweils 1 mm des angrenzenden Knochens.

3.5.4 Histologie

Einbettung

Nach Feststellung eines ausreichenden Dekalzifizierungsgrades wurden die Proben erneut 3 x 15 min in Leitungswasser gewaschen. Es folgte die Anfertigung der Mikro-CT-Scans, wie unter 3.5.3 beschrieben. Daraufhin entwässerten die Proben im Vakuumschrank zunächst über Nacht in 70 % und in den folgenden Tagen für 18 h in 96 % und 24 h in 100 % Isopropanol. Nach zusätzlicher Entwässerung für 18 h in Aceton wurden die Proben über Nacht in flüssiges Paraffin eingelegt. Die Einbettung in Paraffinblöckchen erfolgte zunächst nur bis auf halbe Höhe, so dass der obere Rand der Muskulatur zugänglich blieb. Auf diese Weise war es möglich, an der in Paraffin stabilisierten Probe die Muskulatur bis zur PEEK-Platte abzutragen. So konnten Platte und Schrauben entnommen werden, ohne dass die Defektenden, durch die beim Entfernen der Schrauben entstehenden Scherkräfte, verschoben wurden. Die Entnahme der Osteosynthesematerialien war Voraussetzung, um das Anfertigen der histologischen Schnitte gewährleisten zu können. Folgend musste durch Einschmelzen des Paraffins die Probe zunächst zurückgewonnen werden, um sie dann letztendlich vollständig einbetten zu können.

Histologische Schnitte

Von allen Proben wurden mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms 5 µm dicke Längsschnitte angefertigt, auf Objektträger gezogen und zunächst auf einer Wärmeplatte bei ca. 36 °C und später für 24 h im Wärmeschrank bei 42 °C getrocknet. Hierfür wurden die Paraffinblöckchen bis zum Zentrum der Probe abgetragen und Schnitte aus zwei Ebenen im Abstand von 75 µm gesammelt (Abb. 13).

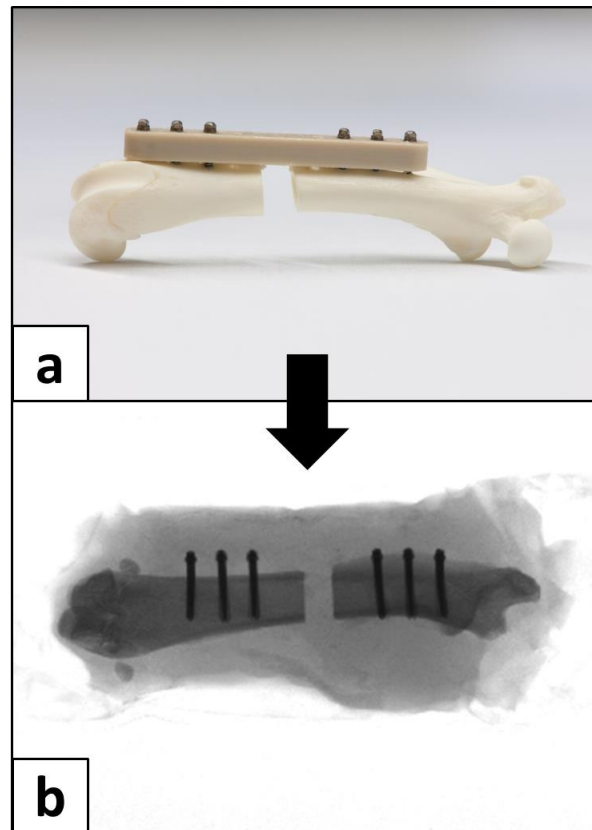


Abbildung 13: Histologische Schnittebene

Femurprobe mit (a) und ohne (b) Osteosynthesematerial. Für die histologischen Färbungen wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Diese wurden als Längsschnitt, senkrecht zu den vorher entfernten Schrauben aus der Mitte des Femurs gewonnen.

Färbungen

1. HE-Färbung

Als Übersichtsfärbung wurde eine Hämatoxilin-Eosin-Färbung angefertigt. Hierfür wurden die Schnitte 4 x 10 min in Roti®-Histol entparaffiniert, jeweils 5 min in absteigender Alkoholreihe (100 % / 96 % / 70 % / 50 % Isopropanol) rehydriert und 2 x 5 min in Aqua destillata (Aq. dest.) gespült, bevor eine 6-minütige Färbung in Hämalaun nach Mayer erfolgte. Nach 20-minütigem Bläuen in Leitungswasser wurden die Schnitte erneut in Aq. dest. gespült und in Eosin für 1 min gegengefärbt. Es folgte dreimaliges Spülen in Aq. dest., eine Differenzierung der Färbung in 96 % und 2 x in 100 % Isopropanol (je 1 min), außerdem die Entwässerung in Roti®-Histol (4 x 5 min) und das Eindecken mit Roti®-Histo-Kit.

2. Giemsa-Färbung

Für die Giemsa-Färbung wurde ein Sörensen-Phosphatpuffer aus zwei Stammlösungen hergestellt. Für die Stammlösung A löst man 9,078 g Kaliumdihydrogenphosphat in 1.000 ml Aq. dest., für die Stammlösung B 11,876 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat. Je nach gewünschtem pH-Wert können die beiden Lösungen kombiniert werden. Für einen pH-Wert von 7,0 werden 61,2 ml der Lösung B mit 38,8 ml der Lösung A gemischt. Folgend wurde Aqua bidestillata (Aq. bidest) mit diesem Puffer versetzt (1:10) und sowohl für die Waschschriffe vor der Färbung verwendet, als auch für die Verdünnung der Giemsa-Lösung (1:50). Der Vorgang des Entparaffinierens wurde mit Xylol (4 x 10 min) durchgeführt. Das Rehydrieren erfolgte wie unter der HE-Färbung beschrieben. Anschließend wurden die Schnitte 2 x 5 min in mit Sörensen-Phosphatpuffer versetzten Aq. bidest (s.o) gewaschen und in einer frisch angesetzten Giemsa-Lösung 2 h gefärbt. Die Differenzierung erfolgte zunächst in 1 % Essigsäure bis sich die Schnitte rötlich färbten, und folgend in 96 % Isopropanol. Nach 2 x 30 s in 100 % Isopropanol und 3 x 5 min in Xylol wurden die Schnitte mit Roti®-Histo-Kit eingedeckt.

3. Immunhistochemische Färbung auf CD68

Für die CD68-Färbung wurde, in Analogie zur HE-Färbung, das Entparaffinieren und Rehydrieren durchgeführt. Zwischen den Inkubationsschritten, die in einer feuchten Kammer stattfanden, wurden die Objektträger in Färbeschiffchen und Küvetten am ersten Tag 3 x 2 min in PBS und am zweiten Tag 3 x 5 min in TBS gewaschen. Das Antigenretrieval wurde mit Hilfe von Proteinase K (202 µg / ml PBS) für 20 min bei 37°C durchgeführt und die unspezifischen Bindungsstellen mit 5 % bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS für 30 min bei Raumtemperatur (RT) blockiert. Über Nacht erfolgte dann bei 4°C die Inkubation der Schnitte mit einem monoklonalen Mouse anti-Rat CD68 Primärantikörper, der 1:100 in einer 1%-BSA-PBS-Lösung verdünnt wurde. Am folgenden Tag wurde der Biotin-konjugierter Ziege anti-Mouse Sekundärantikörper mit einer Verdünnung von 1:500 in TBS verwendet und bei RT 30 min inkubiert. Der Avidin-Biotin-Komplex mit alkalischer Phosphatase wurde nach Herstellerangaben vorbereitet und für 30 min bei RT auf die Schnitte gegeben. Im folgenden Inkubationsschritt wurde Fast Red von der Phosphatase umgesetzt und erzeugte die zytoplasmatische, rote Färbung. Es folgte die Gegenfärbung mit Hämalaun und ein 15-minütiges Bläuen, nachdem die Enzymreaktion durch dreimaliges spülen in Aq. dest. gestoppt wurde. Zum Schluss wurden die Schnitte mit AquaTex eingedeckt.

Auswertung

1. Auswertung der HE-Färbung

Zunächst wurden die HE-Schnitte deskriptiv bezüglich vorhandener Zellen und Gewebe im Defektpalt ausgewertet. Für eine semiquantitative Einschätzung der Größe neu gebildeter Knorpel- und Knochenareale bekamen Tiere mit Standzeiten von 7 und 14 Tagen Scores zugeordnet. Ein Score von 0 entspricht dem Fehlen jeglichen Knorpel- / Knochengewebes, bei einem Score von 3 liegt eine große Menge an Knorpel / Knochen vor (Abb. 14).

Zuletzt wurde eine Quantifizierung der Gefäße pro mm² Defektpalt vorgenommen. Hierfür wurden die Proben fotografiert. Alle Einzelbilder in 100-facher Vergrößerung wurden zu Mosaikbildern zusammengesetzt und die Längenverhältnisse des Defektpalts bestimmt. Alle Gefäße im Defektpalt wurden gezählt. Diejenigen, welche die linke oder die untere Begrenzungslinie schnitten, wurden als Defektpalt zugehörig angesehen, während solche, die auf der Linie rechts oder oben lagen, nicht mitgezählt wurden.

2. Auswertung der Giemsa-Färbung

Eine Auswertung der Giemsa-gefärbten Schnitte erfolgte rein deskriptiv bezüglich der Entzündungszellverteilung im Defektpalt und wurde mit den Ergebnissen der HE-Färbung verglichen.

3. Auswertung der immunhistochemischen Färbung auf CD68

Für die immunhistochemische Auswertung wurden Mosaikbilder in 100-facher Vergrößerung angefertigt, in Photoshop bearbeitet und mit Image J (1.44p Java 1.6.0_20) ausgewertet. Neugebildeter Knochen im Defektpalt wurde von der Berechnung ausgeschlossen, da sich anhaftende Osteoklasten ebenfalls anfärben und das Ergebnis verfälscht worden wäre. So wurde im Defektpalt lediglich der flächenmäßige Anteil von rotgefärbten, CD68-positiven Zellen am weichen Kallus ermittelt (Abb. 15).

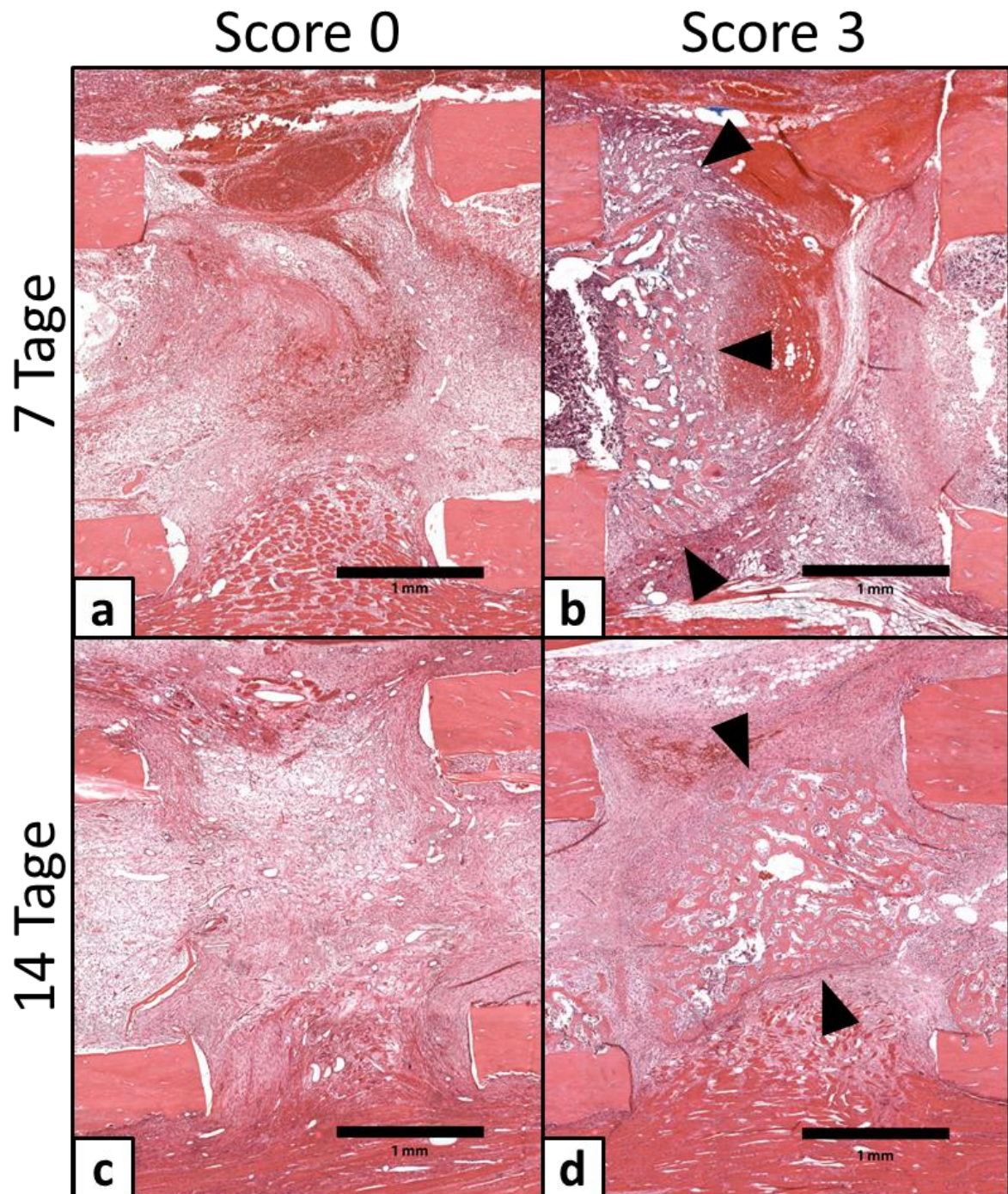


Abbildung 14: Auswertung der HE-Färbung mittels Knochenscore

Semiquantitative Bewertung der gebildeten Knochenmenge im Defektpalt; HE-Färbungen von 5 μ m dicken Paraffinschnitten; Score 0 = Fehlen von jeglichem Knochen- / Knorpelgewebe (7 Tage (a) und 14 Tage *post operationem* (c)); Score 3 = große Menge Knochen- / Knorpelgewebe zu finden (Pfeilspitzen) (7 Tage (b) und 14 Tage *post operationem* (d)); alle Schnitte wurden innerhalb dieser Grenzen einem Score von 0 – 3 zugeordnet.

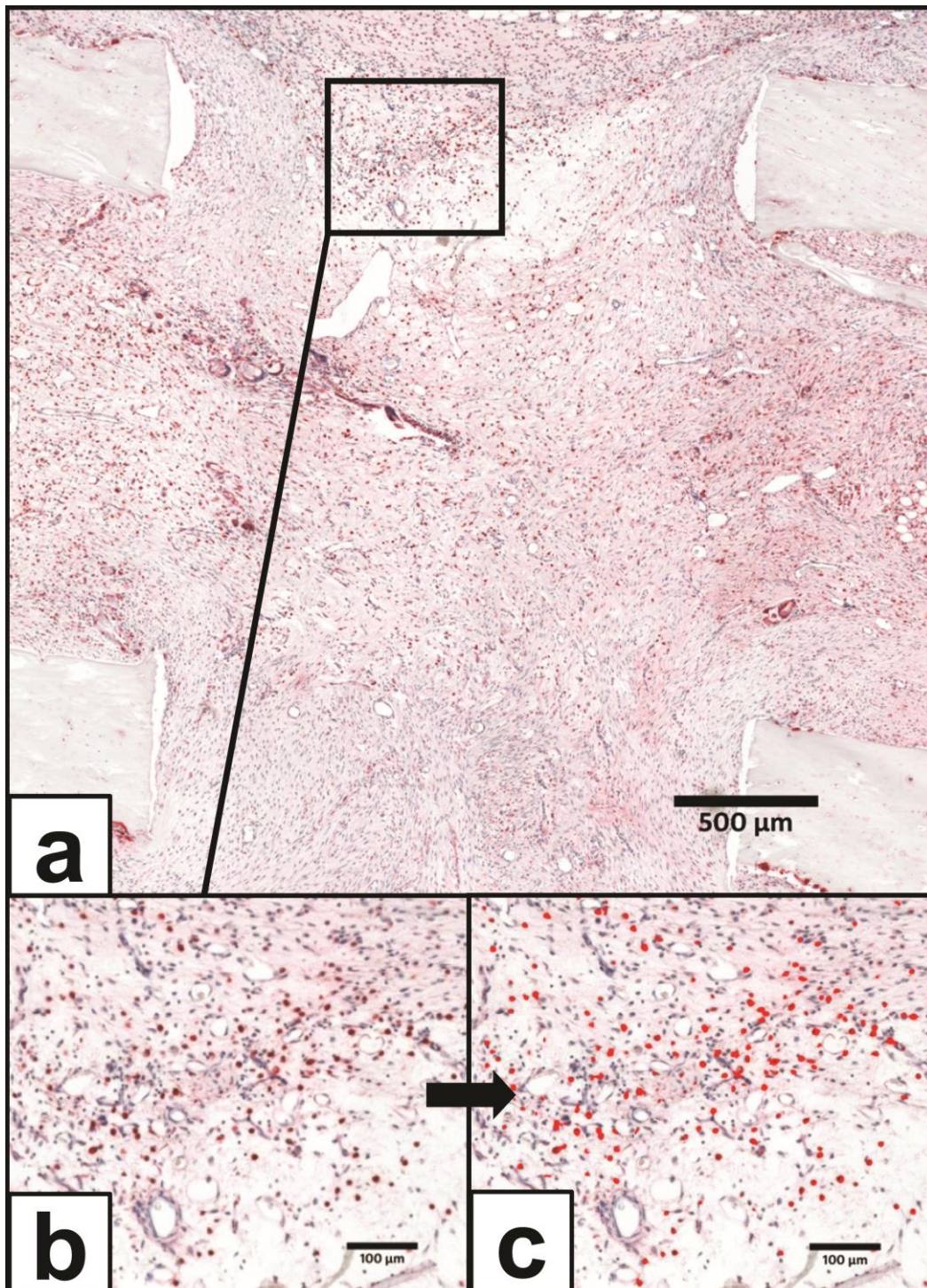


Abbildung 15: Auswertung der Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen auf CD68 von 5 µm dicken Paraffinschnitten, Kernfärbung mittels Hämatoxylin; Übersichtsbild eines Defektpaltes (Mosaikbild) (a); Ausschnitt aus dem kortikalen Bereich des Defektpaltes - Zytoplasma der CD68-positiven Zellen sind rot gefärbt (b); Auswertung der Fläche von CD68-positiven Zellen mit Hilfe von Image J – die rot markierten Bereiche werden von dem Programm als CD68-positiv erkannt und aufsummiert (c).

3.5.5 Biochemische Marker

Zur Bestimmung der VEGF- und BALP-Konzentrationen im Blut wurden ELISAs durchgeführt. Die hierfür benötigten Plasmaproben wurden aus den heparinisierten Blutproben gewonnen (siehe 3.5.1). In Eppendorfgefäßen wurden sie für 20 min bei 1800 Umdrehungen (entspricht 662 g) zentrifugiert. Der abgenommene Überstand wurde danach bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Die Menge an VEGF und BALP im Blut wurde mit Hilfe des jeweiligen ELISA-Kits (siehe tabellarischer Anhang – Färbelösungen und Kits) nach Herstellerprotokoll ermittelt. Die Kits enthalten sowohl eine mit Antikörper beschichtete 96-Well-Platte, als auch den Standard und alle benötigten Lösungen. Für die Bestimmung der VEGF-Spiegel wurden die Plasmaproben unverdünnt eingesetzt, die Bestimmung der BALP-Spiegel setzte eine 1:100-Verdünnung voraus.

Im ersten Schritt werden Standard und Proben in den *Wells* inkubiert, um eine Antigenbindung zu ermöglichen. Daraufhin wird ein mit Biotin konjugierter Antikörper hinzugegeben. Dieser bindet am Antigen und stellt wiederum die Bindungsstelle für den enzymgekoppelten Sekundärantikörper (HRP-Avidin = *Horseradish peroxidase-Avidin*) dar. Im nächsten Schritt folgt die Zugabe des TMB-Substrats (Tetramethylbenzidin), das enzymatisch von der HRP umgesetzt wird und eine blaue Färbung verursacht. Durch Abstoppen der Reaktion mit der *Stop Solution* bildet sich ein gelber Farbkomplex, dessen Konzentration mit der Antigenmenge in der Probe korreliert. Die photometrische Messung wird bei 450 nm Wellenlänge durchgeführt und ermöglicht das Berechnen der Antigenkonzentration.

3.6 Statistische Analyse

Für alle Messwerte der Tiere einer Gruppe wurden zunächst der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) berechnet und graphisch mit Hilfe von Säulendiagrammen dargestellt. Die Bestimmung der Werte und das Erstellen der Tabellen und Diagramme erfolgten in dem Programm Microsoft EXCEL Version 2003. Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Statistikprogramms IBM SPSS Statistics® Version 21.0 (IBM Corporation, New York, US) in Zusammenarbeit mit der zuständigen Statistikerin Simone Gantz durchgeführt. Der Test nach Shapiro-Wilk ergab eine Normalverteilung der Daten. Folglich wurden als Signifikanztests eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) bzw. ein ungepaarter T-Test angewendet. Dabei gelten p-Werte von unter 0,05 als statistisch signifikant.

4. Ergebnisse

4.1 Tierexperimente

Von den insgesamt 36 operierten Tieren verstarben zwei aufgrund eines Atemstillstands während der Laminektomie. Ein drittes Tier verstarb aus ungeklärter Ursache in der ersten Nacht *post operationem*. Bei der Durchführung der Laminektomie und infolge der Kontusion zeigten fast alle Tiere eine temporäre Atemdepression, die sich nach Lösen der Pinzettenklemmen des Impactors normalisierte bzw. mit einer intralingualen Injektion Doxapram (10 mg / kg KG) behandelt wurde. Als Komplikation in den ersten Tagen postoperativ traten bei jeweils zwei Tieren (6 %) Automutilationen an Hinterlauf und Schwanz auf, außerdem Beißen und Lecken an eigenen Operationswunden und an denen anderer Gruppenangehöriger. Während der ersten beiden postoperativen Tage zeigten sechs bzw. neun Tiere (18 / 27 %) Futterverweigerung bzw. Dehydrierung. Über diesen Zeitpunkt hinaus mussten drei Tiere (9 %) zwangsgefüttert und infundiert werden. Pica-Verhalten zeigten alle Tiere unmittelbar nach Erwachen aus der Narkose.

Die Perfusionen verliefen bei 23 Tieren erfolgreich. Bei diesen Tieren färbten sich die Gefäße und das umliegende Gewebe blau (siehe Abb. 10). Im Vergleich fielen jedoch unterschiedliche Färbungsintensitäten zwischen den Tieren auf. In neun Fällen war der Vorgang des Perfundierens aufgrund von Konsistenzveränderungen des Microfils® nicht oder nur teilweise möglich. Diese Tiere wurden von der Mikro-CT-Auswertung ausgeschlossen. Zusätzlich befand sich bei einem Tier der Gruppe A1 ein Teil des Sägedrahtes im Defektpalt, weshalb es, aufgrund entstehender Artefakte im Mikro-CT, ebenfalls in diesem Teil der Auswertung nicht berücksichtigt werden konnte. Somit wurde im Folgenden von jeweils drei Tieren der Gruppe K2 und A1 (Kontrolle 7 Tage und Paraplegie 3 Tage) und vier Tieren der restlichen Gruppen Daten bezüglich der Angiogenese mit Hilfe des Mikro-CTs gewonnen.

4.2 Erzeugung der Rückenmarkskontusion

4.2.1 Impactorgraphen

Die Rückenmarkskontusion verlief bei den meisten Tieren ohne Zwischenfälle und die Graphen entsprachen den Optimalvorgaben aus dem Handbuch (siehe 3.3.3 und Abb. 7 d + e). In drei Fällen gab es eine Abweichung der gemessenen Kraft, bei denen statt der gewünschten 200 kDyn über 6000 kDyn bzw. nur 157 kDyn angezeigt wurden. In diesen Fällen gab es keine makroskopisch auffälligen Unterschiede zu den restlichen Tieren hinsichtlich des Gewebes oder der Tierreaktion auf den *Impact*. Der *Impact* mit geringerer Kraft hatte allerdings zur Folge, dass bei diesem Tier als einziges der BBB-Score *post operationem* bei 3 lag (siehe 4.2.2 und Tab. 5). Die Eindringtiefe der Impactorspitze bei den verschiedenen Tieren lag zwischen 952 μm und 1799 μm . Es konnte keine Korrelation zwischen Eindringtiefe und Schwere der neurologischen Schäden festgestellt werden. In drei Fällen zeigte der Graph ein *Displacement* von 0, obwohl der *Impact* stattgefunden hatte, das Gewebe sich entsprechend darstellte und die Tiere mit den üblichen Muskelkontraktionen reagiert hatten.

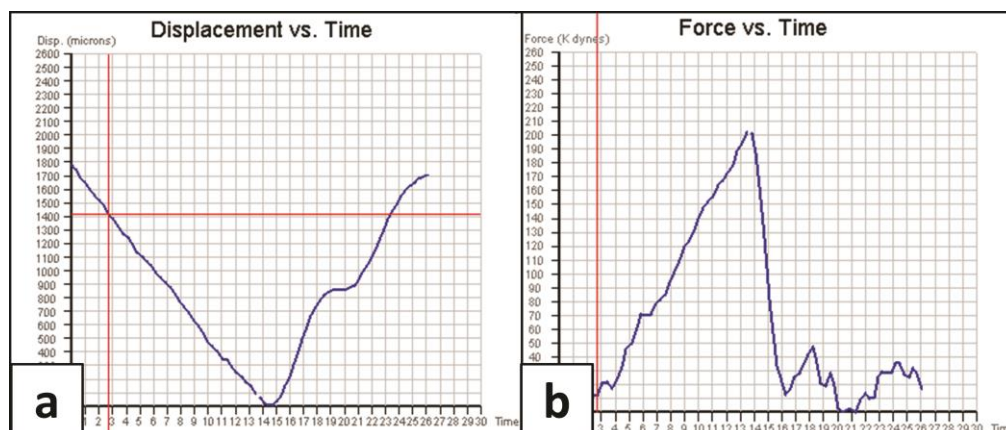


Abbildung 16: Impactorgraphen

Repräsentatives Beispiel der Impactorgraphen eines paraplegischen Tieres belegt die erfolgreiche Durchführung der Rückenmarkskontusion – (a) die Eindringtiefe (in μm) und (b) die Kraft (in kDyn) über die Zeit (in ms); vergleiche Verlauf der Graphen aus Gerätehandbuch Abb. 7.

4.2.2 BBB-Score

Mit Ausnahme von 4 Tieren lag postoperativ bei allen Ratten ein BBB-Score von Null vor (Tab. 5). Auch innerhalb der ersten drei Tage zeigten die Tiere eine vollständig schlaffe Lähmung der Hinterläufe. Alle Tiere der 7-Tages-Gruppe zeigten geringfügige Bewegungen in ein bis zwei Gelenken, meist waren Hüft- bzw. Sprunggelenk beteiligt. Zwei von fünf Tieren konnten bereits alle drei Gelenke bewegen. Nach ca. einer Woche setzte die Miktionsfähigkeit teilweise ein und die Tiere begannen selbständig Urin abzusetzen. Tiere der 14-Tages-Gruppe zeigten ausgiebige Bewegungen aller Gelenke der Hinterhand und ein Aufrichten des Körpers mit teilweise plantarer Fußung. Drei von sechs Tieren konnten sich stehend vorwärts bewegen, ohne jedoch eine dauerhafte Vorderhand-Hinterhand-Koordination zu zeigen (siehe BBB-Score-Tabelle im Anhang).

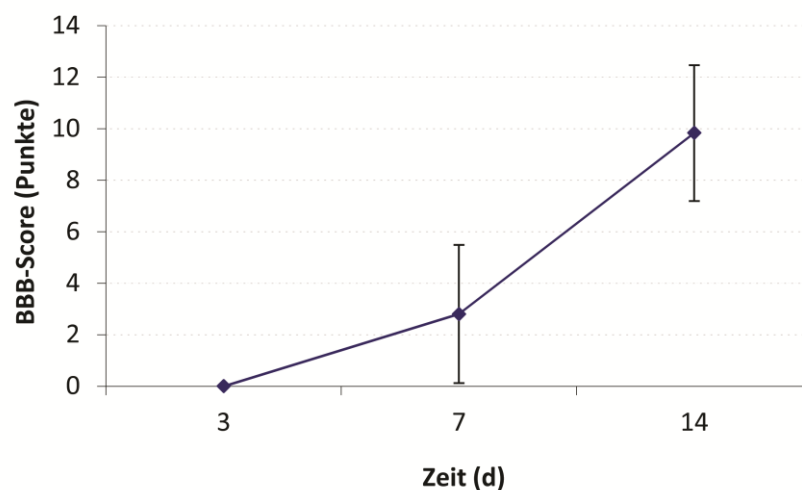


Abbildung 17: Diagramm BBB-Score

BBB-Score (Mittelwerte \pm Standardabweichung) 3, 7 und 14 Tage nach Rückenmarkskontusion zeigen eine kontinuierliche Neuroregeneration über die Zeit anhand der Gangbildanalyse.

Tabelle 5: BBB-Scores

Ermittlung der BBB-Scores durch Auswertung des Gangbildes paraplegischer Tiere *post operationem* und am Ende der Standzeit; Werte zeigen die neurologische Regeneration nach Rückenmarkskontusion

Standzeit	Tier	BBB-Score postoperativ	BBB-Score vor Euthanasie
3 Tage	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
	4	0	0
	5	0	0
7 Tage	6	0	1
	7	0	1
	8	1	7
	9	1	4
	10	0	1
14 Tage	11	3	13
	12	1	12
	13	0	8
	14	0	11
	15	0	9
	16	0	6

4.2.3 Histologie der Kontusionsstelle

In den histologischen Schnitten des Rückenmarks zeigten sich ausgedehnte Nekrosen der Zellen in allen Bereichen (Abb. 18). Kranial und kaudal der Kontusionsstelle unterteilte sich das Rückenmark noch deutlich in innenliegende, graue Substanz mit Perikarya der Nervenzellen und in umgebende, weiße Substanz. Im Bereich der Kontusion konnte auf einer Strecke von über 6,2 mm keine physiologische Zellverteilung mehr nachgewiesen werden, obwohl der Durchmesser des Impactors nur 2,5 mm betrug. Zellschwund, Karyopyknose und Karyorrhexis waren in hohem Maße sichtbar.

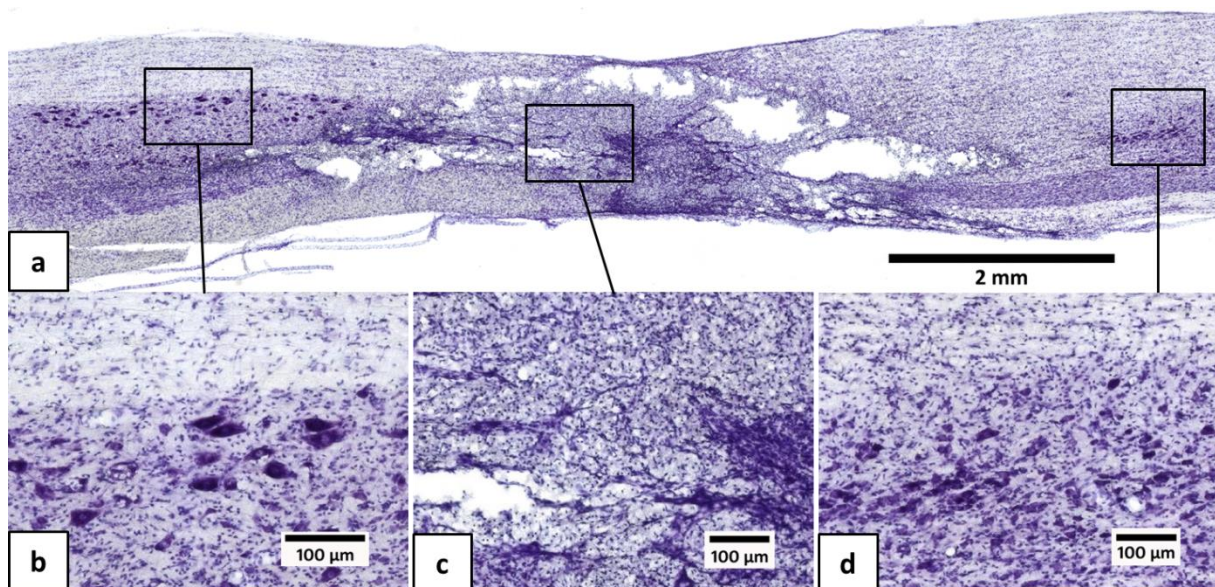


Abbildung 18: Histologischer Schnitt des Rückenmarks

Nissl-Färbungen von 5 µm dicken Cryoschnitten; Mosaikbild der Kontusionsstelle (a); Ausschnitte zeigen die physiologische zytoarchitektonischen Verhältnisse kranial und kaudal des Kontusionsbereiches (b + d); dazwischen sind Zellschwund, Karyopyknose und Karyorrhexis zu erkennen (c).

4.3 Mikro-CT-Analyse

Abbildung 19 (a) zeigt die mittleren Werte der Gefäßvolumina (Vessel Volume, VV) in mm^3 der beiden Gruppen zu den Standzeiten 3, 7 und 14 Tagen. Das VV steigt bei den Kontrolltieren über die Zeit leicht an, während die Paraplegie-Gruppe den höchsten Wert an Tag 3 zeigt. Im Gruppenvergleich liegen die Werte der Paraplegie-Gruppe an Tag 3 höher und an den Tagen 7 und 14 unter denen der Kontrolltiere. Die mittleren Werte der Gefäßoberfläche (Vessel surface, VS) zeigen ähnliche Verhältnisse zueinander, wie sie bei den Gefäßvolumina vorliegen (Abb. 19 b). Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen oder im zeitlichen Verlauf.

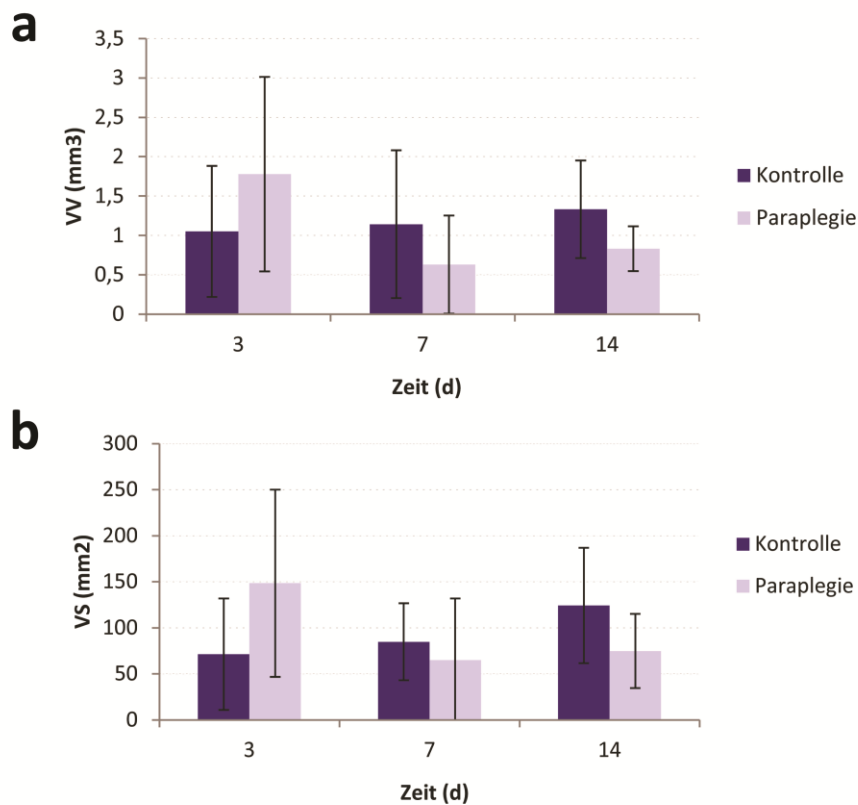


Abbildung 19: Diagramme der Angiographie

Gefäßvolumina in mm^3 (Mittelwerte \pm Standardabweichung, VV = Vessel Volume) im Defektsplatt 3, 7, und 14 Tage nach Osteotomie in paraplegischen Tieren und Kontrollen (a); Gefäßoberfläche in mm^2 (Mittelwerte \pm Standardabweichung, VS = Vessel Surface) im Defektsplatt 3, 7, und 14 Tage nach Osteotomie in paraplegischen Tieren und Kontrollen (b).

Bei 3D-Darstellungen der rekonstruierten Daten wurden runde Strukturen in verschiedenen Größen mit und ohne Verbindung zu den Gefäßverläufen gefunden. Auch zeigten sich ovale Gebilde und verschiedene flächenhafte Formen (Abb. 20).



Abbildung 20: 3D-Darstellung der Gefäße im Defektbereich

Die Abbildung zeigt die Angiographie eines 7-Tage-Tieres; zu sehen sind die Knochenenden (grau) und die mit Microfil® gefüllten Gefäße im Defektbereich (rot); aus bereits bestehenden Gefäßen sprossen neue in Richtung Defektpaltmitte ein; sichtbar sind ebenfalls mehrere runde Strukturen, die ohne Verbindung zum Gefäßsystem vorliegen (Pfeilspitzen) und als Extravasate interpretiert werden könnten, auch sich flächenhaft ansammelndes Kontrastmittel (Sternchen) weist darauf hin.

4.4 Histologie

Histologisch konnte der Perfusionserfolg anhand der Füllung kleinerer Gefäße mit dem Röntgenkontrastmittel nachvollzogen werden (Abb. 21 a, b). Das Microfil® scheint sich durch den Färbevorgang des Schnittes teilweise zu entfärben, so dass in manchen Gefäßen nur noch ein grau-blauer bzw. grauer Schleier zu sehen war. Ebenso zeigte sich, dass Teile des Microfils® aus den Gefäßen in das umliegende Gewebe ausgetreten waren (Abb. 21 c, d). Davon waren, unabhängig der Standzeiten, vereinzelte Tiere aller Gruppen betroffen. Unabhängig vom Perfusionserfolg stellten sich die histologischen Schnitte in einer Heterogenität dar, die der physiologischen Varianz entspricht.

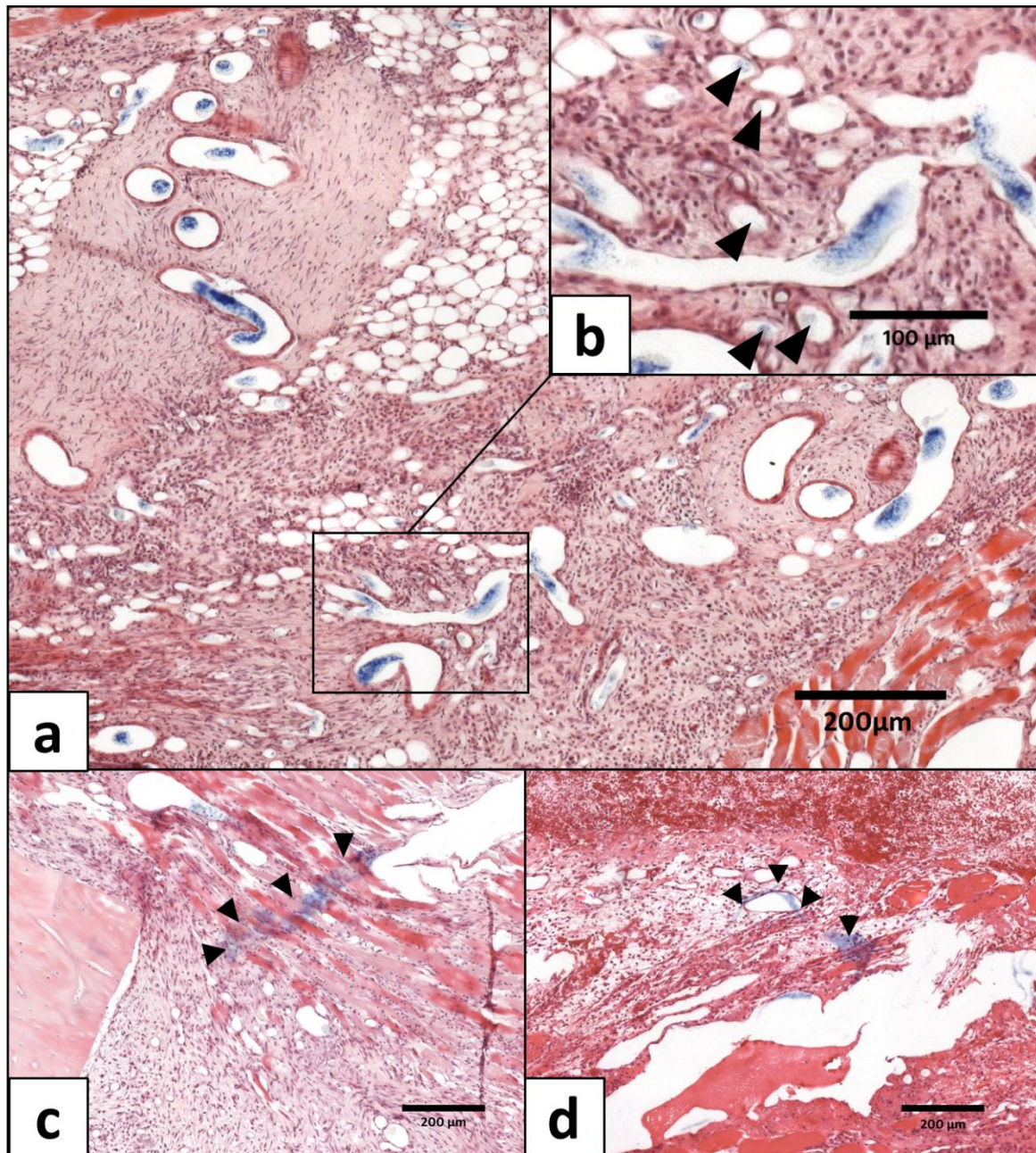


Abbildung 21: Histologischer Nachweis von Microfil®

HE-Färbungen von 5 µm dicken Paraffinschnitten, Längsschnitte; Mosaikbild aus Defektbereich - das röntgendichte Silikongummi Microfil® ist in größeren Gefäßen aufgrund der blauen Farbe gut sichtbar (a); Ausschnitt aus Mosaikbild - trotz ausgewaschener blauer Farbe ist es auch in kleinen Gefäßen als gräulicher Schatten zu erkennen (Pfeilspitzen in b); extravaskulär im Gewebe vorzufindendes Microfil® (Pfeilspitzen in c + d).

3 Tage:

Acht von zehn Tieren mit einer Standzeit von drei Tagen zeigten kleinere Frakturhämatome im Defektspalt (Abb. 22 a). Diese waren bei allen Tieren der Gruppe A (Paraplegie) vorhanden und deutlicher ausgeprägt als bei der Gruppe K (Kontrolle). Hier zeigten zwei von fünf Tieren kleinere und ein Tier ein deutliches Hämatom. Von den Erythrozyten abgesehen wies der Defektspalt größere zellarme Bereiche auf, in denen seröse Flüssigkeit zu sehen war (Abb. 22 b). Bei drei Tieren kam es zu einer Verlagerung von Muskulatur bzw. Bindegewebe aus der Umgebung zwischen die Kortikalisenden (Abb. 22 b). Eine beginnende Zelleinwanderung Richtung Defektspalt war bei allen Tieren sichtbar. Einerseits kamen diese Zellen aus dem umliegenden Gewebe, andererseits wanderten sie aus dem Knochenmark Richtung Defektspaltmitte ein (Abb. 22 b). Bei der A-Gruppe zeigte sich diese Einwanderung aus dem Knochenmark beidseitig, also ausgehend von beiden Defektspaltenden, und im stärkeren Maße als bei der Kontroll-Gruppe.

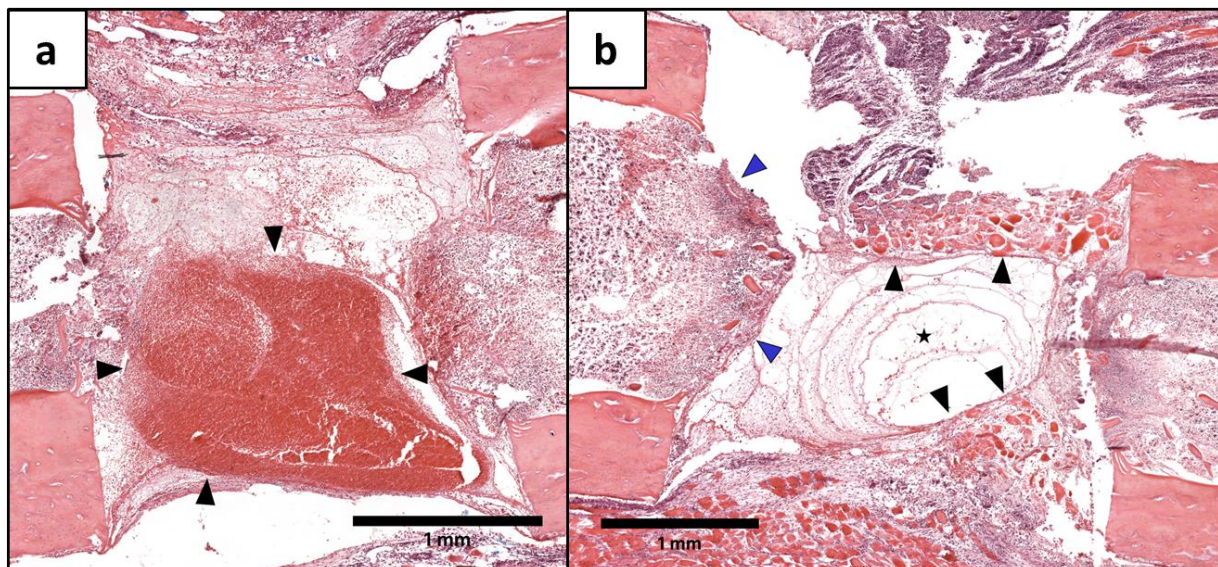


Abbildung 22: HE-Färbung nach 3 Tagen

HE-Färbung von 5 µm dicken Paraffinschnitten, Längsschnitte aus der Femurmitte; Mosaikbilder des Defektspaltes 3 Tage nach Osteotomie; am seitlichen Bildrand sind jeweils die vier Kortikalisenden zu sehen; a: um das große Frakturhämatom (Pfeilspitzen) herum befinden sich vereinzelte Erythrozyten und Entzündungszellen, sowie seröse Flüssigkeit; b: im Defektspalt sind verlagerte Muskelzellen (schwarze Pfeilspitzen), seröse Flüssigkeit (Sternchen) und eine beginnende Auswanderung von Entzündungszellen aus dem Knochenmark (blaue Pfeilspitzen) zu sehen.

7 Tage:

Nach sieben Tagen bildete Regenerationsgewebe, bestehend aus Fibroblasten, Fibrozyten und neugebildeten Gefäßen, einen großen flächenmäßigen Anteil am Defektspace. Zudem waren die ersten Anzeichen einer Entzündung sichtbar. Unter den Entzündungszellen dominierten ein- und mehrkernige Makrophagen, gefolgt von Lymphozyten und Plasmazellen. Vereinzelt waren bei 2 Tieren auch neutrophile Granulozyten zu finden. Frakturhämatome waren ebenfalls noch bei allen Tieren nachweisbar (Abb. 23). In acht von zehn Fällen war eine beginnende Einziehung des umliegenden Gewebes in den Defektspace sichtbar (Abb. 23). Periostale Knochenzubildung im Bereich der Schrauben zeigten alle Tiere im geringen Maße. Diese fielen bei der A-Gruppe tendenziell größer aus. Dagegen kam es im Defektspace selbst, abgesehen von jeweils einem Tier der beiden Gruppen, zu keiner Knochenbildung.

Die semiquantitative Einschätzung der Knochen- und Knorpelmengen im Defektspace ergab keinen Unterschied zwischen den Gruppen. In beiden wurde bei nur einem von fünf Fällen und in gleichem Maße Knochen gebildet. Zusätzlich war bei dem Kontrolltier eine geringe Ansammlung von Knorpelzellen nachweisbar.

14 Tage:

Die periostalen Knochenzubildungen nahmen nach 14 Tagen deutlich an Größe zu und zeigten sich hauptsächlich im Bereich der Schrauben (Abb. 24). Bei sechs von zehn Tieren waren sie aber auch in Defektnähe sichtbar. Die Flächen des periostal gebildeten Knochens unterschieden sich augenscheinlich nicht bzw. kaum zwischen den Gruppen. Eine Knochenneubildung im Defektspace hatte bei mehr als der Hälfte der Tiere begonnen. Sie zeigte sich ein- oder beidseitig zwischen den Kortikalisenden (Abb. 25 a, b) oder mittig im Defektspace (Abb. 25 c). In einem Fall begann die Knochenbildung außen am Periost und überbrückte zusammen mit neu gebildeten Knorpel beinahe den gesamten Space (Abb. 25 d). Die bereits an Tag 7 ansatzweise zu erkennenden Einbuchtungen des Gewebes in den Defektspace wurden bei acht von zwölf Tieren deutlicher (bei fünf Tieren der A-Gruppe und drei Tieren der K-Gruppe). Im Hinblick auf die Knochenneubildung an Tag 14 unterschied sich die Paraplegie-Gruppe von der Kontrolle. Fünf von sechs paraplegischen Tieren zeigten große Knochenareale im Defektspace, während bei den Kontrollen nur zwei von sechs Tieren Knochen bildeten. Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung dieser Knochenareale waren

in beiden histologischen Ebenen gleichermaßen anzutreffen (Tab. 6). Der mittlere Score paraplegischer Tiere war im Vergleich zu Kontrolltieren doppelt so hoch (Faktor 2,1) (Tab. 7).

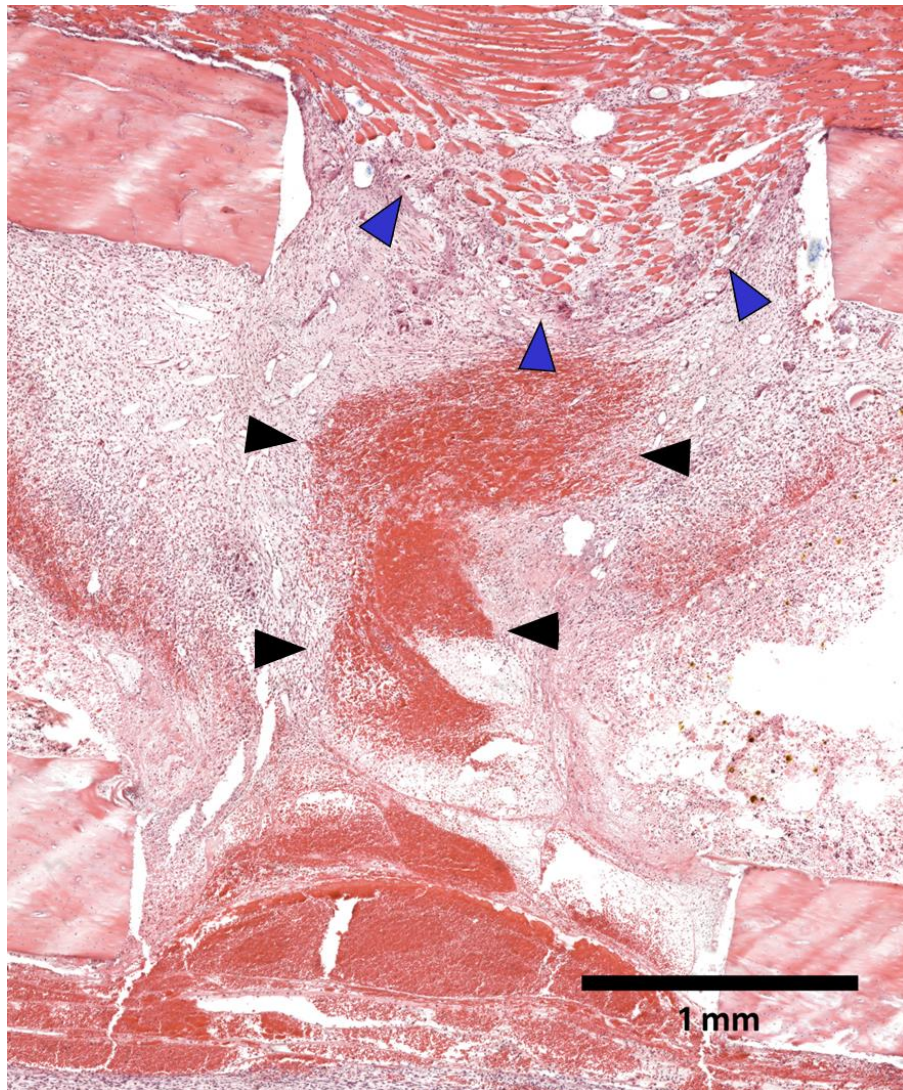


Abbildung 23: HE-Färbung nach 7 Tagen

HE-Färbung eines 5 μ m dicken Paraffinschnittes, Längsschnitt aus der Femurmitte; Mosaikbild des Defektpaltes 7 Tage nach Osteotomie; seitlich im Bild sind die vier Kortikalisenden zu sehen; im Defektpalt befinden sich Reste eines Frakturhämatoms (schwarze Pfeilspitzen); einseitig zeigt sich eine beginnende Einbuchtung des umliegenden Gewebes (blaue Pfeilspitzen).

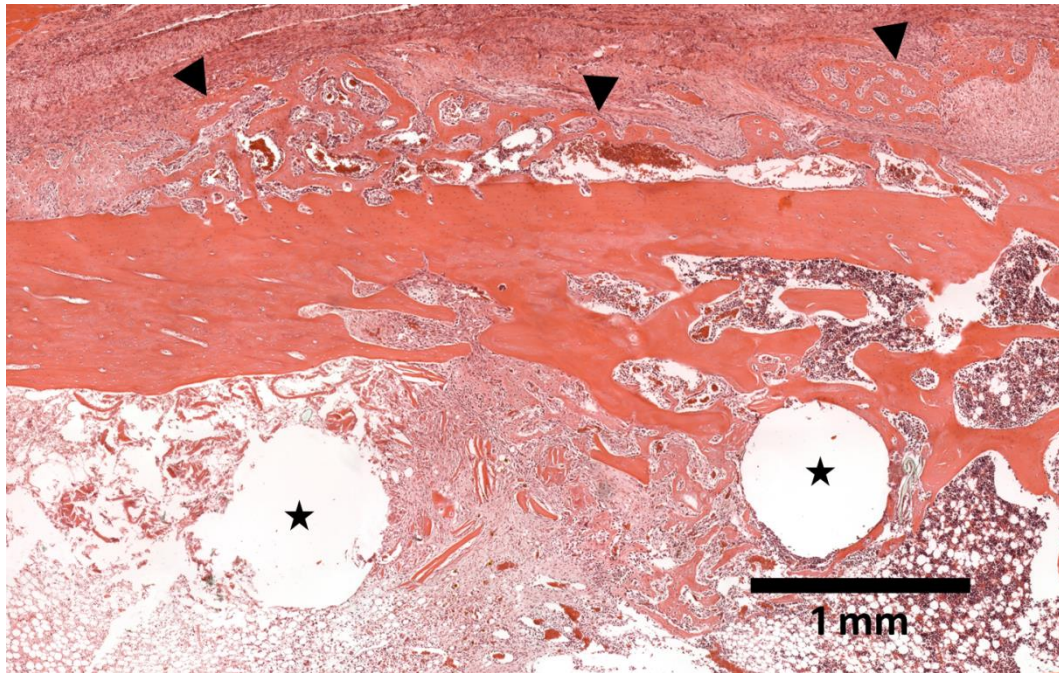


Abbildung 24: Periostale Knochenzubildung nach 14 Tagen

HE-Färbung eines 5 µm dicken Paraffinschnittes, Längsschnitt aus der Femurmitte; Mosaikbild im kortikalen Bereich 14 Tage nach Osteotomie; Pfeilspitzen deuten auf periostale Knochenzubildungen, die sich im Bereich der Schrauben (Sternchen) manifestieren.

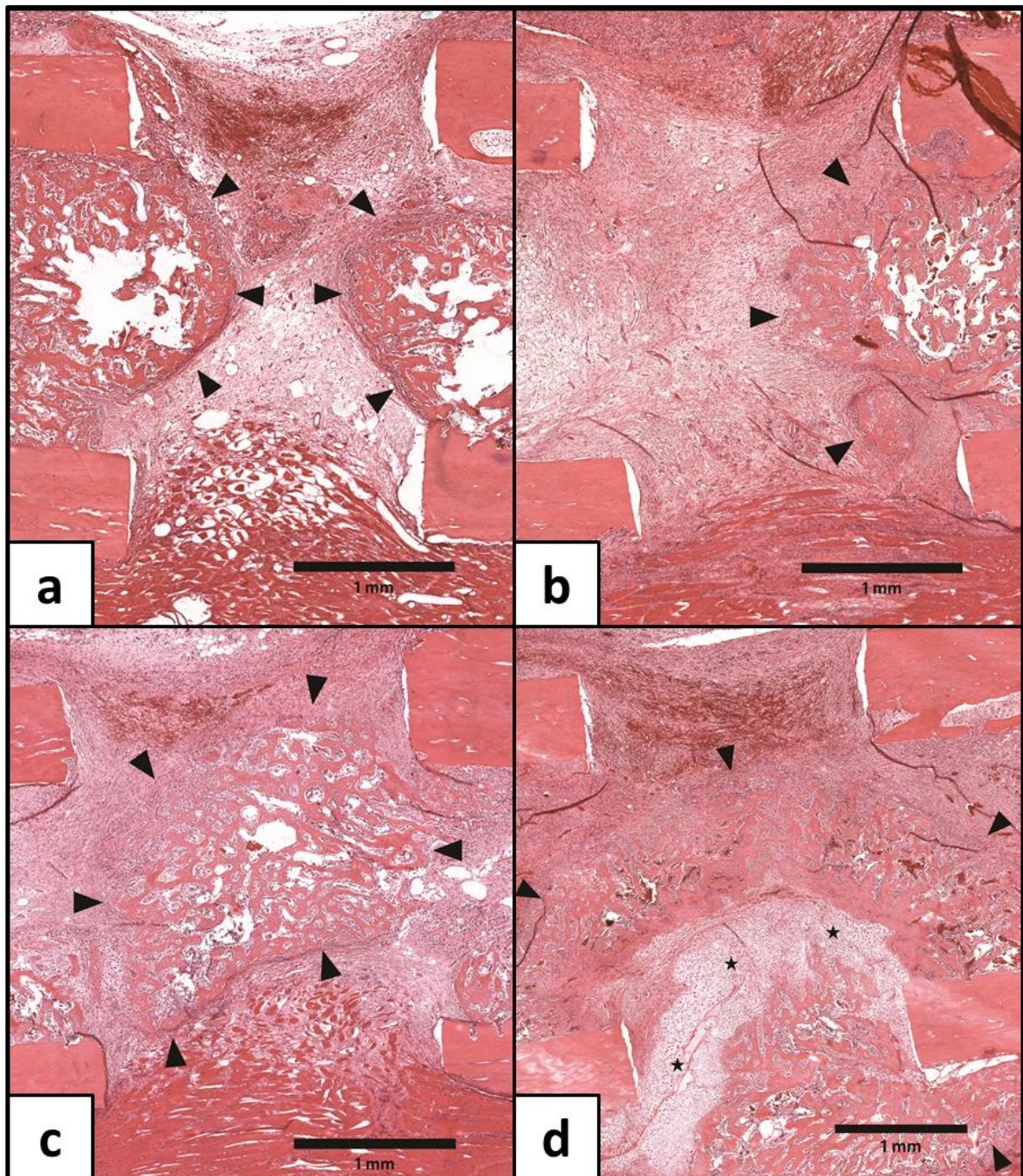


Abbildung 25: HE-Färbung nach 14 Tagen

HE-Färbungen von 5 µm dicken Paraffinschnitten, Längsschnitte aus der Femurmitte; Mosaikbilder des Defektspaltes 14 Tage nach Osteotomie; an den seitlichen Bildrändern sind jeweils die vier Kortikalisenden zu sehen; Knochenneubildungen kommen im Defektspalt beidseitig (a) oder einseitig (b) zwischen den Kortikalisenden vor bzw. zeigen sich mittig im Spalt (c); in einem Falle war eine vollständige Überbrückung der Enden unter Bildung großer knorpeliger Teile zu beobachten (d, Sternchen = Knorpelzellen).

Tabelle 6: Analyse der Knochen- / Knorpelneubildung

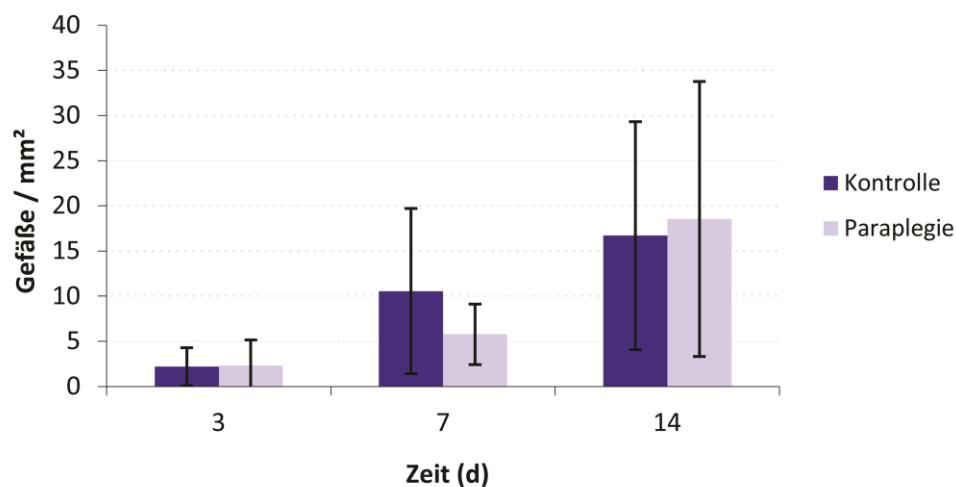
Semiquantitative Einschätzung der Knochen- / Knorpelneubildung im Defektspace und in unmittelbarer Umgebung anhand eines Scores (Scoreeinteilung 0 – 3; siehe 3.5.4 und Abb. 14); ausgewertet wurden HE-Färbungen von Paraffinschnitten

Gruppe	Knochen		Knorpel	
	Ebene 1	Ebene 2	Ebene 1	Ebene 2
Kontrolle 7 d	0	0	0	0
	3	3	1	1
	0	0	0	0
	0	0	0	0
	0	0	0	0
Paraplegie 7 d	3	3	0	0
	0	0	0	0
	0	0	0	0
	0	0	0	0
	0	0	0	0
Kontrolle 14 d	3	3	1	1
	0	0	0	0
	0	0	0	0
	2	2	1	1
	0	0	0	0
Paraplegie 14d	0	0	0	0
	0	0	0	0
	3	3	0	1
	3	3	0	1
	2	3	2	3
	2	2	0	0

Tabelle 7: Mittelwerte der Knochen- / Knorpelscores

	Knochen		Knorpel	
	7 Tage	14 Tage	7 Tage	14 Tage
Kontrolle	0,60	0,83	0,20	0,33
Paraplegie	0,60	1,75	0	0,58

Die Quantifizierung der Gefäßanzahl in den HE-Färbungen ergab bei beiden Gruppen einen deutlichen Anstieg über die Zeit (Faktor 7,6 bei Kontrolle und 8,1 bei Paraplegie) (Abb. 26). Im Mittel unterschieden sich die Tiere der 3-Tages-Gruppen nicht voneinander. Nach sieben Tagen haben die Kontrolltiere tendenziell mehr Gefäße gebildet, was sich an Tag 14 umkehrt. Die geringen Unterschiede erreichen jedoch nicht das Signifikanzniveau und die Werte innerhalb einer Gruppe variieren stark.

**Abbildung 26: Diagramm Gefäßanzahl**

Neugebildete Gefäße pro mm² Defektpalt (Mittelwerte und Standardabweichung) 3, 7 und 14 Tage nach Osteotomie bei paraplegischen Tieren und Kontrollen; Ermittlung durch histologische Analyse der HE-Färbung (Auszählung aller Gefäße im Defektpalt).

Die Giemsa-Färbung der Proben erbrachte im Vergleich zur HE-Färbung identische Ergebnisse. Daher wurde von einer Auswertung der Giemsa-Färbung abgesehen (Abb. 27).

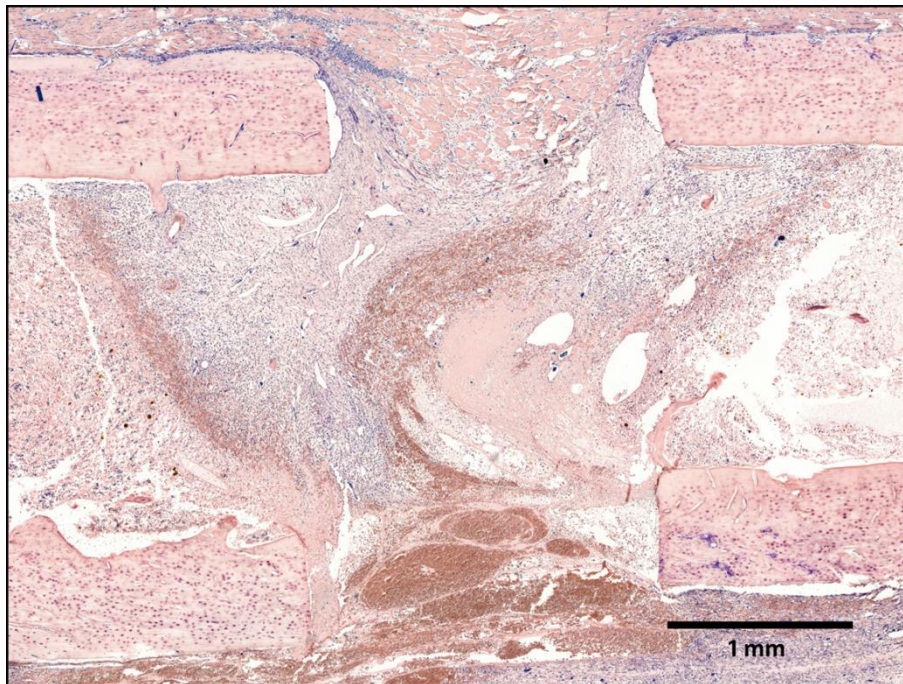


Abbildung 27: Beispiel einer Giemsa-Färbung

Giemsa-Färbung eines 5 μm dicken Paraffinschnittes, Längsschnitt aus der Femurmitte; Mosaikbild des Defektpaltes 7 Tage nach Osteotomie; seitlich in den Bildern sind jeweils die vier Kortikalisenden zu sehen; von einer Auswertung der Giemsa-Färbung wurde aufgrund identischer Ergebnisse im Vergleich zur HE-Färbung abgesehen.

4.5 Immunhistochemie

3 Tage:

Nach drei Tagen stellte sich der Defektpalt mit zellarmen Arealen, seröser Flüssigkeit und / oder mit Frakturhämatomen dar (siehe HE-Färbung). CD68-positive Zellen kamen gehäuft lediglich im angrenzenden Gewebe im Randbereich des Defektpaltes vor. Im Defektpalt selbst zeigten sich nur sehr vereinzelt positive Zellen. (Abb. 28 a, b). Es gab keinen auffälligen Unterschied in Häufigkeit und Verteilung der Zellen zwischen den beiden Gruppen.

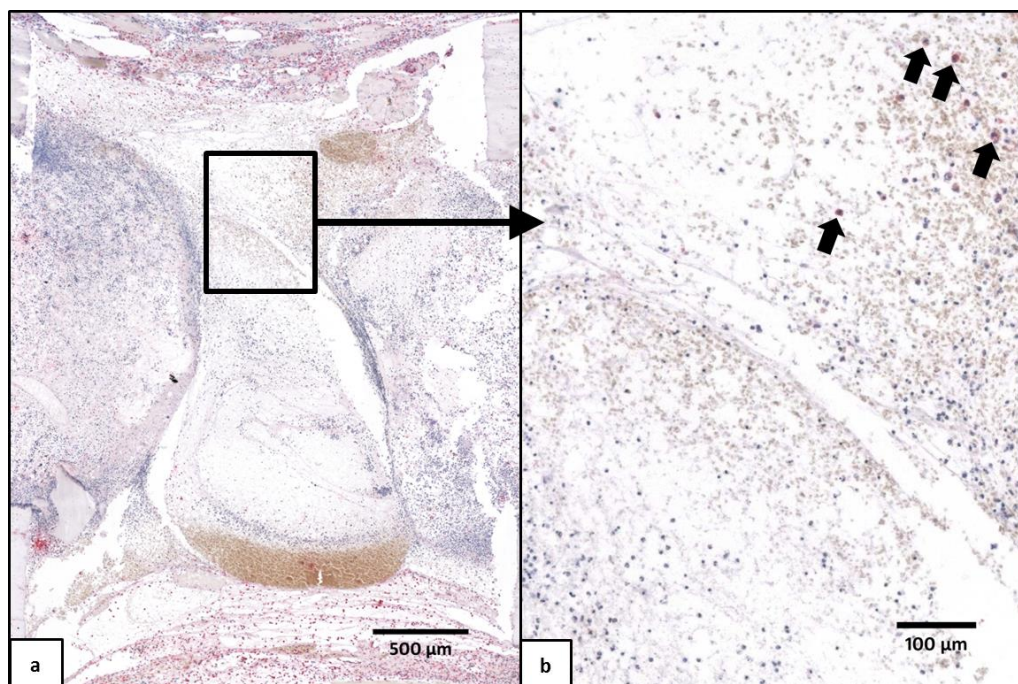
7 Tage:

Nach sieben Tagen war der Defektspace meist zu großen Teilen mit Regenerationsgewebe gefüllt. Hierin verteilten sich die CD68-positive Zellen überwiegend gleichmäßig. Bei 6 von 10 Tieren schien die Einwanderung von einer Seite zu beginnen (Abb. 28 c, d).

14 Tage:

Nach 14 Tagen befand sich mit Ausnahme von einem Tier im gesamten Defektspace Granulationsgewebe, worin sich die CD68-positiven Zellen weitgehend gleichmäßig verteilten. Bei zwei Tieren schienen sie von einer Seite her eingewandert zu sein (Abb. 28 e, f).

Die Auswertung des flächenmäßigen Anteils von CD68-positiven Zellen innerhalb des Granulationsgewebes im Defektspace zeigte bei der Kontrollgruppe keine deutliche Veränderung im zeitlichen Verlauf (Abb. 29). In der Paraplegie-Gruppe stieg er von Tag 7 bis Tag 14 um den Faktor 4,17 und damit signifikant an.



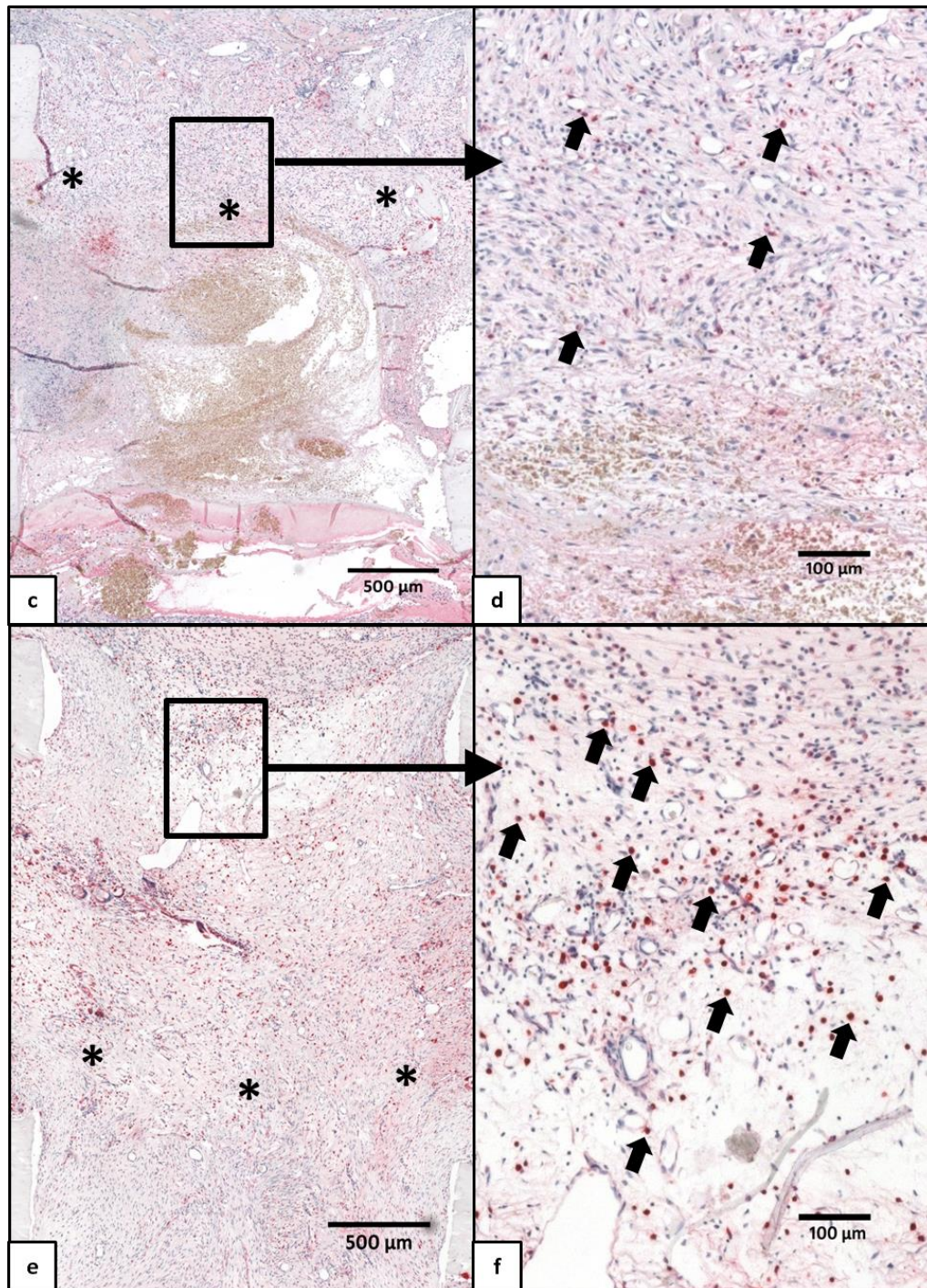


Abbildung 28: Makrophageneinwanderung im zeitlichen Verlauf

Immunhistochemische Färbungen zum Nachweis von CD68; 5 µm dicke Paraffinschnitte; Kernfärbung mittels Hämatoxylin; Mosaikbilder des Defektspaltes 3 Tage (a), 7 Tage (c) und 14 Tage (e) nach Osteotomie – Sternchen zeigen den Fortschritt der Einwanderung von CD68-positiven Zellen im Defektspalt an; Ausschnitte aus den Defektbereichen mit zunehmender Anzahl an CD68-positiven Zellen (b, d, f – Pfeile).

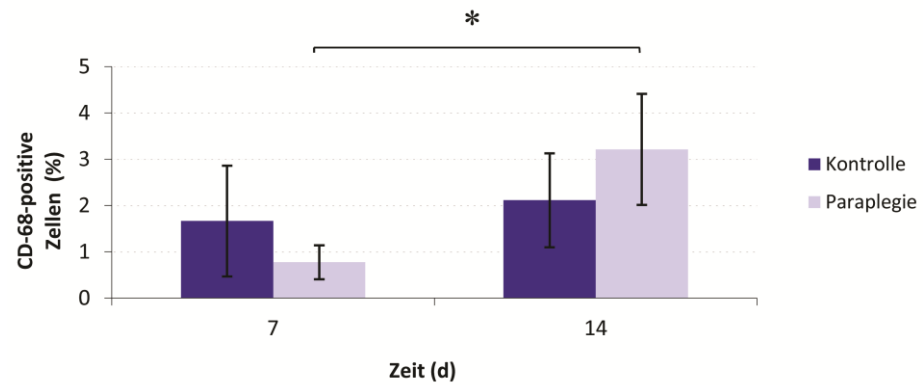


Abbildung 29: Diagramm Inflammation

Anteil der CD68-positiven Zellen im weichen Kallus des Defektspaltes (%) ermittelt durch eine immunhistochemische Färbung 7 und 14 Tage nach Osteotomie in paraplegischen Tieren und Kontrollen; signifikanter Anstieg der inflammatorischen Reaktion in der paraplegischen Gruppe; verknöcherte Bereiche wurden von der Auswertung ausgeschlossen, da sie ebenfalls CD68-positiv Osteoklasten enthalten und das Ergebnis der inflammatorischen Reaktion verfälscht hätten; überwiegend seröse Flüssigkeit in den 3-Tages-Gruppen verursachten Färbeartefakte und verhinderten die quantitative Auswertung, weshalb diese lediglich deskriptiv ausgewertet wurden.

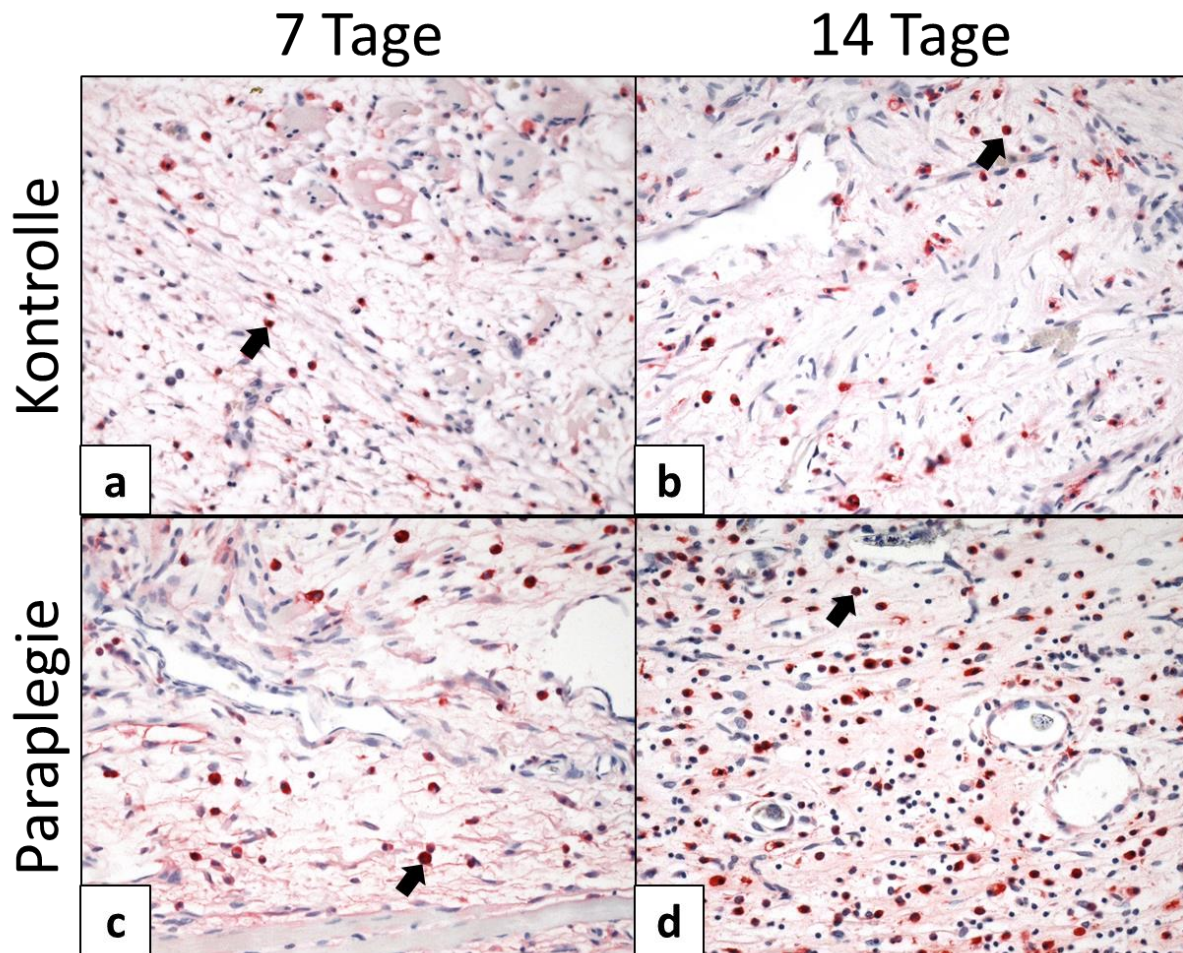


Abbildung 30: Makrophageneinwanderung im Gruppenvergleich

Immunhistochemische Färbungen zum Nachweis von CD68; 5 µm dicke Paraffinschnitte; Ausschnitte aus dem Defektspace (200-fache Vergrößerung); das Zytoplasma von CD68-positiven Zellen ist rot gefärbt, Kernfärbung mittels Hämatoxylin; in der Kontrollgruppe zeigt sich eine gleichbleibende Menge (a, b), bei paraplegischen Tieren ein signifikanter Anstieg der Makrophagenanzahl in dem Zeitraum zwischen 7 und 14 Tagen nach Osteotomie (c, d).

4.6 Biochemische Marker

4.6.1 VEGF

Die VEGF-Plasmakonzentration lag in beiden Gruppen und zu allen Zeitpunkten über dem Level des Referenztieres ohne operativen Eingriff. An Tag 3 und 7 war sie in der Kontrollgruppe stärker erhöht, gleichete sich jedoch bis Tag 14 an das Niveau der paraplegischen Tiere an (Abb. 30 a).

4.6.2 BALP

Auch die mittleren BALP-Plasmaspiegel waren an Tag 3 und Tag 7 in beiden Gruppen im Vergleich zum Referenztier ohne operativen Eingriff erhöht (Abb. 30 b). Der Wert der Kontrollgruppe *peakte* an Tag 7 und fiel danach ab. An Tag 14 lag er immer noch um den Faktor 1,4 über dem Referenzwert. Die Paraplegie-Gruppe zeigte an Tag 3 die höchsten Werte und sank bis Tag 14 stetig und signifikant ab. Sie erreichte am letzten Zeitpunkt das Niveau des Referenztieres und zeigte damit einen signifikant niedrigeren Wert im Vergleich zur Kontrollgruppe.

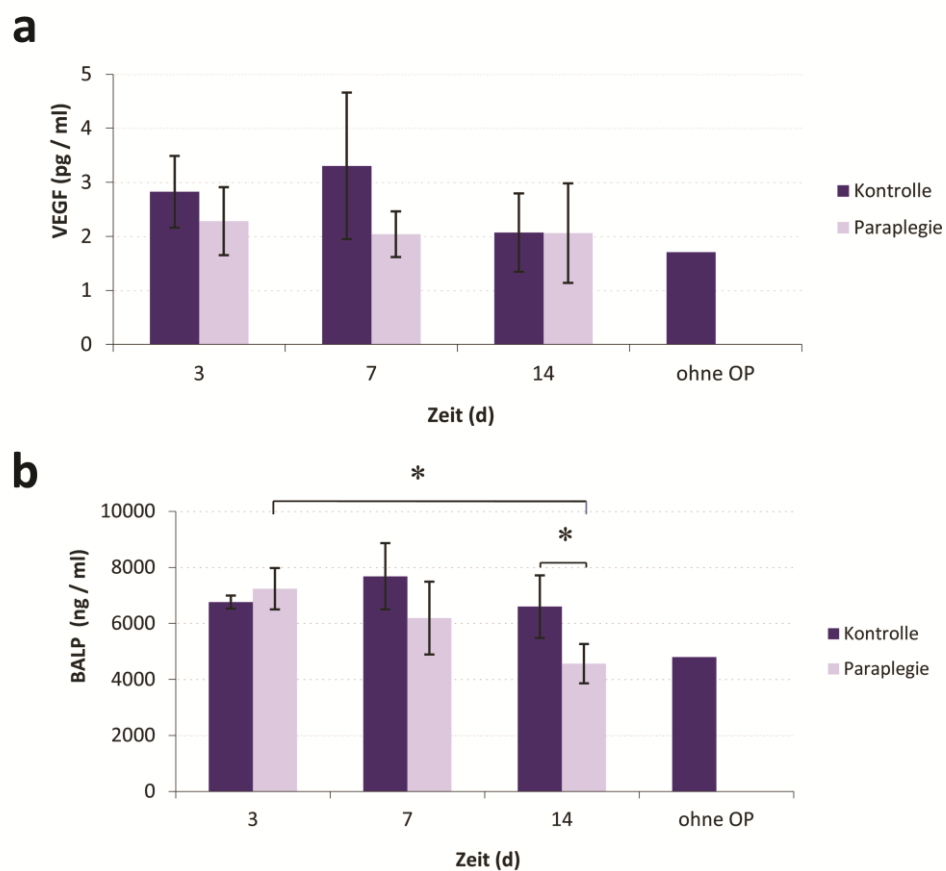


Abbildung 31: Diagramme biochemischer Marker

VEGF-Plasmakonzentrationen („Vascular Endothelial Growth Factor“, pg / ml) (Mittelwerte \pm Standardabweichungen) 3, 7, und 14 Tage nach Osteotomie in paraplegischen Tieren und Kontrollen (a); BALP-Plasmakonzentrationen („Bone Alkaline Phosphatase“, ng / ml) (Mittelwerte \pm Standardabweichungen) 3, 7 und 14 Tage nach Osteotomie in paraplegischen Tieren und Kontrollen (b); als Interpretationshilfe der Ergebnisse wurden jeweils zusätzlich die Plasmakonzentrationen eines unbehandelten Tieres ohne Knochen- und Rückenmarksverletzung gemessen (ohne OP).

5. Diskussion

5.1 Tiermodell

5.1.1 Wahl des Tier- und Operationsmodells

Die Knochenheilung wird heutzutage neben dem Schaf- am häufigsten im Nagermodell untersucht, obwohl der Knochenaufbau und der Heilungsprozesses nicht völlig mit humanen Verhältnissen übereinstimmen. So haben Ratten zwar lamellären Knochen, aber eine geringere Remodelierungsrate und einige Unterschiede im Knochenaufbau und der Knochendichte bzw. -qualität (Aerssens et al. 1998). Es gibt jedoch auch keine andere, in der tierexperimentellen Forschung verwendete Tierspezies, die eine exakte Übereinstimmung mit menschlichem Knochengewebe gewährleisten könnte. Mäuseknochen besitzen kein Havers-System (Holstein et al. 2009). Schafsknochen unterliegen zwar einem ständigen *Remodeling* und besitzen eine ähnliche Heilungsrate, bestehen aber aus plexifomen Knochen, ähnlich dem des menschlichen Geflechtknochens, und besitzen weniger Havers-Kanäle (Newman et al. 1995; Aerssens et al. 1998; Pearce et al. 2007). Der Grund, warum das Schafmodell zunehmend in den Hintergrund rückt, sind wohl die mittlerweile auch für andere Tierarten verfügbaren Materialien zur Durchführung experimenteller Studien. So ist es mittlerweile möglich, in Kaninchen, Ratten und Mäusen der humanen Versorgung entsprechende Osteosynthesen durchzuführen. Hinzu kommen weitere Vorteile, wie geringere Kosten für Beschaffung, Haltung und Versuchsaufbau, die Möglichkeit, viele Tiere auf kleinem Raum zu halten und die höhere Verfügbarkeit aufgrund kurzer Reproduktionszyklen. Zudem gibt es für die Forschung etliche Antikörper und eine große Auswahl an genetisch manipulierten Tieren (Histing et al. 2011). Durch verfügbares Material in kleineren Abmessungen wäre sowohl die hier angewandte Operationsmethode (Histing et al. 2009), als auch die Perfusion (Langheinrich et al. 2006) in beiden Nagermodellen möglich gewesen. Aufgrund der kleineren anatomischen Strukturen fällt die Operation im Mausmodell jedoch weit schwieriger aus und die Verwendung eines Mikroskops ist nicht nur bei der Kontusion nötig. Auch sollte eine Vergleichbarkeit mit der Vorstudie gewährleistet werden, weshalb die Studie im Rattenmodell durchgeführt wurde.

Nennenswerten Einfluss auf die Knochenqualität und die Frakturheilungszeit haben, neben der Spezies, auch das Alter und das Geschlecht. Junge Tiere sind in der Lage, schneller Knochen zu bilden. Bei älteren dagegen läuft die Mitose langsamer ab, eine geringere Zellzahl tritt in den Zellteilungszyklus ein und aus mesenchymalen Stammzellen entstehen weniger Osteoprogenitorzellen (Bergman et al. 1996). Zudem ist bei älteren Tieren eine erhöhte Osteoklastenanzahl (Mehta et al. 2010) und eine verminderte Expression von Angiogenesefaktoren nachgewiesen (Beausejour 2007). Bei der Auswahl des Geschlechts ist der hormonelle Zustand zu bedenken. Weibliche Tiere besitzen ohnehin eine geringere Biegefestigkeit des Knochengewebes und eine geringere Anzahl MSCs (Strube et al. 2009). Hinzu kommt der Einfluss durch Zyklusstand, Trächtigkeit oder Laktation (Bowman and Miller 1999). Wird mit männlichen Tieren gearbeitet, entfallen diese Variationsmöglichkeiten, jedoch ist die Haltung oft schwieriger und in Gruppen nur eingeschränkt oder gar nicht möglich.

In dieser Studie wurden Tiere im Alter von 3 - 6 Monaten verwendet. Durch die Wahl weiblicher Tiere konnte eine einfachere und tierschutzgerechte Haltung in Gruppen gewährleistet und die Vergleichbarkeit zur Vorstudie ermöglicht werden. Hinzu kommt die aufgrund der Paraplegie täglich mehrfach nötige Blasenentleerung, die bei weiblichen Tieren einfacher durchzuführen ist.

5.1.2 Narkose und Medikation

Nager sind schwierige Narkosepatienten, weshalb bei langen, operativen Eingriffen idealerweise mit Inhalationsnarkose gearbeitet werden sollte, um das Risiko für Narkosezwischenfälle zu senken. Bei der Kontusionserzeugung mit Hilfe eines Impactors ist eine Inhalation hingegen nur schwer möglich. Das Tier müsste aufgrund der Schläuche in unmittelbarer Nähe zum Inhalationsgerät bleiben und könnte nicht zum Kontusionsgerät gebracht werden. Hinzu kommt das hohe Risiko eines Verrutschens der Narkosemaske beim Umbetten der Tiere. Aus diesen Gründen wurde in Zusammenarbeit mit Frau Viviana Grajales Robles ein Injektionsnarkoseprotokoll erarbeitet. Narkosen aus Ketamin – Xylazin – Kombinationen gingen mit einer zu langen Nachschlafphase einher. Kombinationen aus Ketamin und Medetomidin sind teilweise antagonisierbar, bewirkten jedoch trotzdem eine lange Nachschlafphase. In dieser Zeit kam es zu massiven Unterkühlungen. Zudem stellt die

Nahrungskarenz in der Zeitspanne der Operation und der Nachschlafphase für den Verdauungstrakt von Nagern eine Belastung dar. Nach Narkoseeinleitung kam es zum Teil zu starken Atemdepressionen und *post operationem* benötigten die Tiere ein bis zwei Tage, um sich restlos von der Narkose zu erholen. Mit Hilfe der vollständig antagonisierbaren Anästhesie (VAA) konnte hingegen ein zuverlässiges Narkoseprotokoll etabliert werden, mit dem kaum Tierverluste zu verzeichnen waren. Die VAA verursacht höhere Kosten, die Dokumentationspflicht des benötigten Fentanyls und die kurze Haltbarkeit des angemischten Antidots von maximal 24 h verkomplizieren die Anwendung. Außerdem mussten die Tiere *post operationem* aufgrund des gezeigten Pica-Verhaltens überwacht werden. Demgegenüber steht eine sehr gute Verträglichkeit. Die Tiere lagen stabil in Narkose und es kam auch bei Überdosierung zu keiner Atemdepression. Dank der vollständigen Antagonisierung erwachten die Tiere bereits 3 – 5 min nach Verabreichung des Antidots und begannen mit der Futteraufnahme. Probleme mit Unterkühlungen *post operationem* traten durch sofortige Bewegungsaktivität nicht mehr auf.

Eine postoperative Schmerzmedikation ist obligatorisch. Nichtsteroidale Antiphlogistika modulieren jedoch über die Hemmung der Cyclooxygenase und folgend der Prostaglandinbildung die Entzündungsreaktion. Sie greifen also in eine wichtige Phase der Knochenheilung ein. Die Dauer der Applikation ist zudem nicht standardisierbar, da der Zustand von jedem Tier individuell beurteilt und die Medikation bei Bedarf verlängert werden muss. Um diesbezüglich keine Varianzen zu erzeugen, wurde auf Opioide zurückgegriffen. Die postoperative Behandlung mit Buprenorphin hatte, vermutlich durch niedrigere Dosierung, ein geringeres Pica-Verhalten zur Folge als das in der Narkose verwendete Fentanyl. Aus diesem Grunde war nach Applikation kein erhöhter Überwachungsaufwand nötig und Buprenorphin als Schmerzmedikation gut anwendbar.

5.1.3 Knochen und Defektmodelle

Bei der Wahl der Defektstabilisierung waren mehrere Aspekte zu berücksichtigen. Zum einen muss bei einer Mikro-CT-Auswertung das Osteosynthesematerial aufgrund der im CT entstehenden Artefakte entweder aus röntgenstrahldurchlässiger Materie gefertigt sein oder vor einem Scan entfernt werden. Eine Entfernung des Materials zu einem so frühen Zeitpunkt der Heilung hätte jedoch eine Zerstörung der zu untersuchenden Strukturen nach sich

gezogen, da die Defektenden nach drei und sieben Tagen noch nicht durch einen festen Kallus stabilisiert sind. Zum anderen ist die Lokalisation des Materials entscheidend. Intramedullär eingebrachte Systeme befinden sich im zentralen Abschnitt des Knochendefekts und hätten die Heilung in dem zu untersuchenden Bereich beeinflusst bzw. einen beachtlichen Anteil des Auswertungsbereichs eingenommen und eine Regeneration an dieser Stelle verhindert. Ein drittes Kriterium ist die Stabilität. Ein intramedullärer Nagel hätte zu einer sogenannten relativen Stabilität geführt und Mikrobewegungen zugelassen. Diese Bewegungen können zu einer gesteigerten Kallusbildung führen. Somit hängt bei einem Fixationssystem mit relativer Stabilität die Knochenneubildung auch vom Bewegungsausmaß der Tiere ab. Bei paraplegischen Tieren, die nicht in der Lage sind ihre Hinterextremitäten zu benutzen, findet die Knochenheilung ohne Einwirkung von Belastung und Bewegung statt. Kontrolltiere dagegen belasten unmittelbar postoperativ ihre Hinterbeine vollständig und bewegen sich öfter und in größerem Umfang. Aus diesem Grunde war die Verwendung eines Systems mit absoluter Stabilität Voraussetzung, um die Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen gewährleisten und vorhandene Gruppenunterschiede dem neurologischen Trauma zuordnen zu können. Eine Möglichkeit der winkelstabilen Fixierung stellt der *Fixateur externe* dar. Er liegt außerhalb der Haut und birgt daher ein erhöhtes Infektionsrisiko. Dagegen wird als internes System die Platte mit winkelstabilen Schrauben direkt am Knochen angebracht. Auf diese Weise stellt sie weder ein Infektionsrisiko dar, noch werden die Tiere in ihrem Bewegungsumfang eingeschränkt.

Das in dieser Studie verwendete, mittlerweile gut etablierte System wurde am AO Development Institute, Davos entwickelt (Heiner et al. 2006; Histing et al. 2011; Forster et al. 2013) und besteht aus einer röntgenstrahlendurchlässigem PEEK-Platte. Auf diese Weise entstehen Artefakte nur um die Schrauben herum, welche ohnehin weit genug von dem Defektpalt entfernt platziert werden. Sollen lediglich im Defektpalt selbst Untersuchungen mit Hilfe eines CTs vorgenommen werden, handelt es sich daher um ein gut geeignetes System. Alle benötigten speziellen Instrumente, wie Sägelehre und Schraubendreher, können kommerziell bezogen werden.

Die verwendete Methode der Knochenstabilisierung hat sich bereits in der Vorstudie als zuverlässig erwiesen. Es zeigte sich, dass sie auch für die Ziele dieser Studie sehr gut geeignet war. Alle Osteosynthesen konnten den Belastungen standhalten und die Tiere wurden durch sie nicht beeinträchtigt. Die anatomische Drehung des Femurs war bei älteren Tieren stärker

ausgeprägt, was das Auffinden einer Position erschwerte, in der die Platte dem Knochen plan auflag. Bei jüngeren Tieren war das Femur kaum länger als die Platte selbst. Dieser Umstand verlangte nach einer erhöhte Achtsamkeit bei der Platzierung der Schrauben, die nicht in den Gelenkspalt eingebracht werden dürfen. Schlussendlich erscheint ein Alter von ca. 4 Monaten optimal, um Knochenheilung bei Sprague-Dawley-Ratten mit dieser Methode zu untersuchen.

5.1.4 Perfusion

Um die neugebildeten Gefäße im Defektspace mit Hilfe des Mikro-CTs sichtbar machen zu können, musste das Gefäßsystem zunächst mit einem Röntgenkontrastmittel gefüllt werden. Microfil® ist ein zunächst flüssiges Kontrastmittel, das nach Mischen der Komponenten langsam zu einem gummiartigen Stoff polymerisiert und einen inneren, dreidimensionalen Abdruck des Gefäßsystems formt. Laut Hersteller schrumpft es bei Aushärtung kaum und gewährleistet so eine gute Gefäßfüllung. Auch gibt es keine Interaktion mit Blut, weshalb vor Anwendung eine Spülung des Gefäßsystems nicht notwendig ist. Um einer Blutgerinnung v.a. in kleinen Gefäßen vorzubeugen, wurde das entsprechende Bein jedoch trotzdem mit Heparin versetzter NaCl-Lösung gespült. Die alleinige Perfusion des operierten Beines schien einer vollständigen Perfusion des ganzen Tieres überlegen zu sein. Auf diese Weise wurde nicht nur weniger Material verbraucht, auch konnte die Perfusion schneller durchgeführt werden, wodurch das Risiko einer Viskositätssteigerung durch eine beginnende Materialaushärtung gesenkt wurde.

Für die Darstellung von Gefäßen in Weichteilgewebe ist Microfil® gut geeignet. Die Röntgendichte ist der eines Knochens allerdings sehr ähnlich, was die Gefäßperfusion innerhalb oder in direkter Umgebung von Knochen erschwert (Sider et al. 2010). Aus diesem Grunde wurden die Proben vor dem Scan entkalkt. So konnte verhindert werden, dass bei Tieren mit einer Standzeit von 7 und 14 Tagen ossifizierte Kallusbereiche bzw. neugebildeter Knochen im Defektspace fälschlicherweise als Gefäßvolumen mitberechnet wurden. Dennoch ist aufgrund der vorliegenden Ergebnisse dieser Studie, die Zuverlässigkeit der Methode anzuzweifeln. Nach der Perfusion konnte bereits makroskopisch eine unterschiedliche Färbungsintensität der Gefäße und des umliegenden Gewebes zwischen den verschiedenen Tieren festgestellt werden. Histologisch wurden teilweise kleinere Gefäße ohne Microfil® sichtbar, was auf eine fehlende Füllung durch unzureichende Perfusion schließen lässt.

Denkbar wäre auch, dass das Kontrastmittel während der histologischen Färbung ausgewaschen wurde. Allerdings war an einigen Stellen intravasal blau-graues bzw. graues Material zu sehen. Das wiederum spricht für ein Auswaschen des Farbstoffes, nicht aber des Kontrastmittels an sich. Neben dieser mangelnden Gefäßfüllung wurde stellenweise histologisch eine Blaufärbung auch außerhalb des Gefäßsystems vorgefunden. Hierbei könnte es sich um Artefakte infolge der Paraffinschnittanfertigung handeln. Mit größerer Wahrscheinlichkeit sind aber Gefäße durch den Perfusionsvorgang verletzt worden, wodurch das Microfil® in umliegendes Gewebe austreten konnte. Diese Vermutung bekräftigen die 3D-Darstellungen der Mikro-CT-Daten, in denen kugelförmige Gebilde unterschiedlicher Größe und ohne ersichtlichen Zusammenhang zu den Gefäßen zu finden sind.

Gefäßperfusionen sind bereits seit mehreren Jahrzehnten bekannt (Strohfeldt 1973) und auch die Untersuchung von Knochengewebe mit dieser Methode ist beschrieben (Zhang et al. 2010; Alt et al. 2011; Donneys et al. 2011; Nyangoga et al. 2011; Donneys et al. 2012). Auffälligkeiten, wie sie in dieser Studie auftraten, werden darin jedoch nicht erwähnt. Eine Ursache könnte in der manuellen Durchführung der Perfusion liegen, die in den meisten anderen Studien maschinell durchgeführt wurde. Der intravasale Druck war manuell nicht überprüf- und standardisierbar und könnte bei den betroffenen Tieren zu Gefäßzerreißen geführt haben. Jedoch wurde auch die manuelle Durchführung bereits als erfolgreiche Methode veröffentlicht (Nyangoga et al. 2011). Eine andere denkbare Ursache ist die frühe Phase der Untersuchung. Die genannten Studien führten ihre Perfusionen mehrere Wochen *post operationem* durch (Ausnahme: Nyangoga et al. 2011 perfundierten bereits nach 12 Tagen). Nach drei Tagen Standzeit sind jedoch durch die Operation verursachte Gefäßläsionen noch nicht vollständig repariert. Der Perfusionsdruck könnte Thromben gelöst und ein Austreten des Kontrastmittels ins Gewebe ermöglicht haben. In diesem Falle wäre eine auf Perfusionsvorgang basierende Untersuchung in einer so frühen Phase der Heilung generell nicht möglich. Volumen und Oberfläche der entstandenen Extravasate wurden bei der Berechnung neugebildeter Gefäße mit einbezogen. Die so entstandenen, verfälschten Ergebnisse sind nur im eingeschränkten Maße miteinander vergleichbar. Die Aussagekraft der mit Hilfe des Mikro-CTs gewonnenen Daten muss daher hinterfragt werden.

5.1.5 Modell der Rückenmarksverletzung

In der Vorstudie wurde die Rückenmarksläsion mit Hilfe einer Ballondilatation (Vanický et al. 2001) durchgeführt. Die Entscheidung das Modell zu wechseln, wurde vor allem aufgrund der schwer zu erreichenden Standardisierbarkeit getroffen, aber auch aufgrund vermehrter Atemstillstände während des Kompressionsvorgangs. Generell hat die Verwendung dieser Methode den Nachteil nicht unter Sichtkontrolle arbeiten zu können. Der Ballon wird in den Wirbelkanal eingeführt und aufgeblasen. Liegt er nicht mittig, resultiert einseitig eine stärkere Läsion. Die Weite des Rückenmarkkanals könnte zudem individuell und vor allem altersabhängig variieren. In diesem Fall würde ein gleich großer Ballon in einem engeren Kanal einen höheren Druck auf das Rückenmark ausüben als in einem weiteren. Die Möglichkeit ein *feedback* über ausgeübten Druck oder Gewebekompression zu bekommen und so einen erfolgreichen Vorgang zu erkennen, liefert die Methode nicht. Die Vorrichtung, durch die eine konstante Menge Flüssigkeit in den Ballon gedrückt werden sollte, war zudem schwer zu bedienen und ermöglichte kein präzises Vorgehen. Der Verdacht keine gleichbleibenden Läsionen in den Tieren zu erzeugen, wird durch das Ergebnis der Vorstudie unterstützt (Dissertationsschrift J. Holschbach, Tierärztliche Hochschule Hannover, bislang nicht publiziert). Bei der Einschätzung der neurologischen Schäden und deren Regeneration mit Hilfe des BBB-Scores fielen hohe Varianzen auf. Eine Ballondilatation mit 20 µl für 5 min soll laut Vanický et al. (2001) eine starke Läsion verursachen. Auch nach 4 Wochen erholen sich diese Tiere nur bis zu einem BBB-Score von 2,5. In der Vorstudie wurde die Kompression mit gleicher Ballongröße sogar für 20 min durchgeführt. Trotzdem zeigten sich große Abweichungen zwischen den Scores. Während bei einigen Tieren nach zwei Wochen keinerlei Regeneration stattgefunden hatte (BBB-Score = 0), hatten andere sich bereits vollständig erholt (BBB-Score = 21). Nach vier Wochen konnten alle Tiere wieder normal laufen (BBB-Score = 21). Vermutlich ist der verwendete Rattenstamm verantwortlich für die großen Unterschiede zu Vanický et al. (2001). Diese verwendeten die wesentlich kleineren Wistar-Ratten und könnten so mit einem Ballon gleicher Größe eine größere Kraft auf das Rückenmark erzielt haben. Die Varianzen, die innerhalb der Gruppen von Sprague-Dawley-Ratten während der Vorstudie auftraten, sind dadurch jedoch nicht erklärbar. Aus genannten Gründen wurde das Modell der Rückenmarksverletzung im Vergleich zur Vorstudie daher geändert.

Kompressionsmodelle sind gut geeignet eine Wirbeldislokation bzw. einen Bandscheibenvorfall zu simulieren. Durch die anhaltende Kompression des Gewebes, erzeugen sie die Läsionen durch mechanische und vaskuläre Faktoren (Vanicky et al. 2001). Kontusionsmodelle simulieren dagegen eine Stoßverletzung, die mit Hilfe des kurzen, stumpfen Traumas die häufig vorkommenden Verletzungen in der Humanmedizin besser widerspiegeln können. Zu beobachtende neuropathologische Ereignisse sind die sich ausbreitende hämorrhagische Nekrose, Ödeme, sich teilweise regenerierendes Gewebe und Bildung von Zysten im atrophierten Gewebe (Hayes and Kakulas 1997; Vaccaro et al. 1998). Tiermodelle mit stumpfem Trauma scheinen all diese Vorgänge erfolgreich zu induzieren (Noble and Wrathall 1985; Bresnahan et al. 1987; Bresnahan et al. 1991; Guizar-Sahagun et al. 1994).

Daher sollte in dieser Studie das Trauma mit Hilfe eines Kontusionsmodells verursacht werden. Hierfür stehen zwei Geräte zur Auswahl. Der New York University Impactors (NYUI) lässt ein Gewicht aus unterschiedlicher Höhe auf das Rückenmark fallen. Bei einem Abprallen des Gewichts von dem Gewebe besteht die Gefahr einer zweiten, ungewollten Kontusion (Gruner 1992). Die Energie, die das RM im Falle eines Abpralls wirklich aufnimmt, hängt von der Differenz zwischen der Anfangsgeschwindigkeit und Geschwindigkeit nach Auftreffen ab (Kwon et al. 2002). Diese „Austrittsgeschwindigkeit“ wird vom Gerät nicht gemessen. Bei Verwendung eines Ohio State University Impactor (OSUI) wird die Kontusion elektronisch gesteuert. Die gewünschte Kraft wird am PC eingegeben und ein Abprallen bzw. ein zweiter unkontrollierter *Impact* ist durch das aktive Zurückziehen der Impactorspitze nicht möglich (Stokes 1992). Einwirkende Kraft, Tiefe der Gewebekompression und Zeit werden gemessen und in Verlaufskurven dargestellt. So können Ist-Soll-Abweichungen durch technische Fehler sofort erkannt und betroffene Tiere aus der Studie ausgeschlossen werden. Auch selbstverschuldete Fehler, wie ein Auftreffen der Impactorspitze auf Knochen durch unzureichende Präparation während der Laminektomie, sind sofort ersichtlich.

Aufgrund der genannten Vorteile wurde in dieser Studie ein OSUI verwendet. Nachteilig war der geringe Spielraum unter dem Gerät. Eine Wärmeplatte, die eine Unterkühlung der Tiere verhindert hätte, konnte nicht verwendet werden. Da Nager in Narkose sehr schnell unterkühlen und das Einspannen der Dornfortsätze in die Haltevorrichtung des Gerätes mind. 5 bis 8 min in Anspruch nahm, mussten sie in dieser Zeit umständlicher Weise mit Heißluft

gewärmt werden. Auch bedarf es für das Einspannen der Tiere ein gewisses Maß an Geschick und Erfahrung. Bei ungenügender Präparation oder falschem Befestigen der Pinzetten besteht die Gefahr, dass Tiere durch den *Impact* aus der Halterung rutschen. Grundsätzlich ist der OSUI aber eine gute Möglichkeit standardisierte Rückenmarkskontusionen zu induzieren. Die erfolgreiche Durchführung der Methode konnte anhand der Impactorgraphen nachvollzogen werden. Sowohl Erfolg, als auch Ausmaß der Verletzung waren histologisch sichtbar. Auch vier Wochen *post operationem* konnte im Bereich der Kontusion auf einer Strecke von über 6,2 mm keine physiologische Zell- und Gewebearchitektur mehr nachgewiesen werden, obwohl der Durchmesser des Impactors nur 2,5 mm betrug. Ein weiterer Indikator für eine standardisierte Durchführung ist der BBB-Score, anhand dessen die gleichförmigen neurologischen Schäden und Regenerationen deutlich wurden. Bis auf eine Ausnahme zeigten alle Tiere einen Tag *post operationem* einen BBB-Score von 0 oder 1. Auch gab es keine größeren Schwankungen zwischen den Tieren am Ende der Standzeit. Scheff et al. (2003) beschreiben eine Regeneration nach einer Kontusion mit 200 kDyn innerhalb von 7 Tagen auf einen Score von ca. 7 und nach 14 Tagen auf einen Score von ca. 9. Im Mittel zeigten Tiere aus dieser Studie nach 7 Tagen eine Verbesserung des Scores auf 2,8 und nach 14 Tagen auf 9,8. Den Untersuchungen von Scheff et al. (2003) zufolge ist die Regeneration nach 7 Tagen demnach weiter fortgeschritten, die Ergebnisse sind aber durchaus vergleichbar.

Blutdruckabfall, Bradycardie bzw. Bradyarrhythmie und ein neurogener Schock werden meistens durch spinale Läsionen kranial des 6. Brustwirbels verursacht (Hagen et al. 2011). Auch die Nerven zur Innervation der Atemmuskulatur entspringen aus dem Hals- und vorderen Brustwirbelbereich. Durch die Lokalisation an Th 9 sollten diese Zwischenfälle in der Studie ausgeschlossen sein. Dennoch wurden temporäre Atemdepressionen bei der Vorbereitung und Durchführung der Laminektomie und Kontusion beobachtet. In gewissem Maße wirkt sich vermutlich jede Rückenmarksverletzung im thorakalen Bereich zunächst auf die Atmung aus. In Zusammenhang mit der Ballonmethode nach Vanický traten jedoch massive Atemdepressionen auf, die sich in vielen Fällen lediglich durch Verminderung des Druckes auf das Rückenmark infolge von Ablassen der Flüssigkeit aus dem Ballon beheben ließen. Atemdepressionen infolge der hier verwendeten Kontusionsmethode traten vorübergehend auf und normalisierten sich in der Regel ohne Doxaprambehandlung selbständig. Eine kurzzeitig einwirkende Kontusion scheint demnach von narkotisierten Tieren besser toleriert zu werden als eine dauerhafte Kompression.

Bezüglich der Operationsdauer dürfte die Kontusionsmethode der Ballondilatation nicht überlegen sein. Die Kontusion erfordert eine genauere Präparation, die nur unter Verwendung eines Mikroskops durchführbar ist, und die sichere Befestigung der Dornfortsätze in den Halterungen des Impactors. Beides verlängert den Eingriff. Dennoch implementiert die Kontusionsmethode die Möglichkeit, operierte Tiere nach einer kurzen Einwirkungsphase auf das Rückenmark umgehend aus der Narkose aufwachen zu lassen. Das verringert die Zeitspanne, in dem der Organismus mit einer zeitgleichen Belastung von Narkose und Nervenschädigung zurechtkommen muss.

5.2 Angiogenese

Als Angiogenese wird die Bildung neuer Gefäße aus bereits bestehenden bezeichnet (Salcedo et al. 2005; Portal-Nunez et al. 2012). Die große Bedeutung des Vorgangs für die Wundheilung ist bekannt und gut erforscht (Werner and Grose 2003), aber auch ein Zusammenhang der Angiogenese mit der Bildung von Knochengewebe wurde schon früh entdeckt (Trueta and Trias 1961; Trueta and Buhr 1963). Die Gefäßneubildung spielt demnach auch während der Frakturheilung eine wichtige Rolle (Kanczler and Oreffo 2008; Santos and Reis 2010). Durch Zerreißen im Weichteilgewebe ist das Gefäßsystem unterbrochen. Die adäquate Sauerstoffversorgung kann nur gewährleistet werden, wenn neue Gefäße in das betroffene Gebiet einsprossen. Eine Störung bzw. Verzögerung dieses Vorgangs führt zu einer schlechten Blut- bzw. Sauerstoffversorgung im Frakturbereich, was zu nicht heilenden (Nonunions) bzw. verzögert heilenden (Delayed Unions) Knochendefekten beiträgt (Dickson et al. 1995; Brinker and Bailey 1997). Eine gute Blutversorgung alleine kann zwar nicht den Erfolg einer Knochenheilung garantieren, denn auch bei ausreichender Durchblutung ist das Auftreten von Pseudarthrosen möglich (Brownlow et al. 2002; Reed et al. 2002; Harry et al. 2009). Dennoch ist der Stellenwert von Sauerstoff unverkennbar, wenn man sich die grundlegenden Vorgänge auf zellulärer Ebene anschaut, an denen das Molekül beteiligt ist (Lu et al. 2013). Sauerstoff ist für den aeroben Metabolismus und die Aktivität vieler Enzyme unverzichtbar. Er ist an der Kollagensynthese beteiligt (Kivirikko and Prockop 1967) und regelt als Signalmolekül die Expression von Angiogenesefaktoren (Fong 2009). *In vitro* können zudem unterschiedliche Zellreaktionen auf den vorherrschenden Sauerstoffdruck beobachtet werden. So sezernieren Makrophagen in hypoxischer Umgebung

angiogenesestimulierende Faktoren und stellen diese Produktion ein, sobald sie an normale Raumluft zurückkehren (Knighton et al. 1983). Ein erhöhter Sauerstoffdruck regt Osteoblasten zur Proliferation und Mineralisation an (Wu et al. 2007), während ein verminderter Druck Osteoklasten und die Knochenresorption aktiviert (Arnett et al. 2003; Muzylak et al. 2006). Embryonale Knochenexplantate zeigen bei hohem Sauerstoffdruck die Bildung kalzifizierender Kollagenmatrix, während bei niedrigem vorwiegend hyaliner Knorpel gebildet wird (Bassett and Herrmann 1961; Knöfler 1967). Auch wird die Bedeutsamkeit des Sauerstoffs für die Osteogenese z.B. in Tiermodellen deutlich, bei denen eine Stimulierung der Angiogenese in einer verbesserten Knochenheilung resultiert (Tarkka et al. 2003; Peng et al. 2005). Demzufolge bestand der begründete Verdacht, eine Veränderung der Kallusbildung auf unterschiedliche Mengen neugebildeter Gefäße zurückzuführen und diese genauer zu untersuchen.

Die Auswertungsmethoden ergaben unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Gefäße im Defektspace. Die Mikro-CT-Auswertung spiegelte in der Kontrollgruppe ein ansteigendes Gefäßvolumen über die Zeit wider, was bei einer Knochendefektheilung auch zu erwarten ist. Bei paraplegischen Tieren dagegen zeigten die Daten am dritten Tag ein höheres Volumen im Auswertungsbereich als nach einer Woche. Dieser Werteverlauf ist unwahrscheinlich und steht im Widerspruch zu der histologischen Färbung. Sowohl bei Kontrollen als auch in der Paraplegie-Gruppe waren Gefäße am dritten Tag histologisch lediglich in der Muskulatur des Randbereichs zu finden. Im Defektspace selbst nahm die Anzahl und Fläche der neugebildeten Gefäße über die Zeit zu. Ebenso ließen enorme Standardabweichungen der Mikro-CT-Analyse innerhalb der Gruppen und 3D-Darstellungen der rekonstruierten CT-Scans ein Vorliegen des Microfils® als Extravasat im Gewebe vermuten. Diese Extravasate wurden bei der Auswertung vollständig erfasst und erhöhten die Volumenergebnisse der vermeintlichen Gefäße. In der Histologie dagegen wurden nur einzelne Ebenen ausgewertet. Die Gefäße wurden hierbei nicht aufgrund des Microfils®, sondern anhand ihrer Mikromorphologie identifiziert, wodurch die Ergebnisunterschiede zwischen den beiden Auswertungen wohl zustande kamen. Das alles unterstützt die These, dass eine vernünftige Aussage basierend auf den Mikro-CT-Ergebnissen nicht möglich ist (siehe 5.1 Perfusion). Die vorhandenen Extravasate könnten sich durch Gefäßzerreißen gebildet haben, die infolge eines zu hohen Perfusionsdrucks aufgrund der manuellen Durchführung entstanden sind. Besonders an Tag 3 könnte es dadurch zum Wiedereröffnen von noch nicht verheilten Gefäßläsionen infolge der Operation gekommen sein. Zudem könnte in der Kontrollgruppe der Umbau zu einem

stabileren, fibrinösen Thrombus durch Bewegungen des operierten Beines schneller vorangetrieben worden sein. So hätten reparierte Gefäßabschnitte in Kontrolltieren einem höheren Perfusionsdruck standhalten können als solche in paraplegischen, was die Unterschiede zwischen den Gruppen an Tag 3 erklären würde.

Aussagekräftigere Ergebnisse brachte die histologische Auswertung. Die Quantifizierung der Gefäße in beiden Ebenen brachte vergleichbare Daten hervor und der zu erwartende Anstieg der Gefäßzahl über die Zeit war zu erkennen. Zu Beginn waren Gefäße nur im Randbereich der Defektzone vorhanden und wuchsen im weiteren Verlauf als Bestandteil des Granulationsgewebes in die Mitte des Spaltes ein. Die hohen Standardabweichungen sind wohl durch eine individuelle Heilungsgeschwindigkeit und das daraus resultierende jeweilige Heilungsstadium bedingt. Während einige Tiere nach 14 Tagen keinen Knochen gebildet hatten, zeigten andere einen großen knöchernen Anteil am Defektspace. In diesen verknöcherten Arealen sind kaum oder keine Gefäße mehr vorhanden. Obwohl der Gefäßanteil im immer kleiner werdenden weichen Kallus zwischen 7 und 14 Tagen weiter steigt, kann die absolute Gefäßanzahl im Defektspace durch einen hohen verknöcherten Anteil stagnieren oder sogar abnehmen. Da jedoch keine Unterschiede zwischen den Gruppen nachgewiesen werden konnten, scheint die Angiogenese nicht die Ursache für die vermehrte Knochenbildung zu sein.

Das lassen auch die Ergebnisse der VEGF-Konzentrationsbestimmung vermuten. Der *Vascular Endothelial growth factor* ist einer der bedeutendsten Angiogenesefaktoren (Gotz et al. 2012). Er stimuliert die Entwicklung des Endothels von Arterien, Venen und Lymphgefäßen (Ferrara and Davis-Smyth 1997; Giannoudis et al. 2006; Augustin et al. 2007; Giannoudis et al. 2007) und hat auch direkten Einfluss auf die Knochenbildung. So wurde die Expression von VEGF und dessen Rezeptoren in Osteoblasten und Osteoklasten (Tombran-Tink and Barnstable 2004) und dessen Wirkung als Osteoblastenstimulator (Dai and Rabie 2007) bzw. als Chemokin und Aktivator für Osteoklasten (Engsig et al. 2000; Aldridge et al. 2005) nachgewiesen. Im Zuge der Knochenheilung kann eine Hemmung der VEGF-Funktion sogar die Kallusformation verhindern (Ferguson et al. 1999; Tatsuyama et al. 2000).

Die Ausschüttung des Faktors wird unter anderem durch eine hypoxische Umgebung ausgelöst (Portal-Nunez et al. 2012), wie sie im Defektbereich aufgrund fehlender Blutgefäße vorliegt. Bei einer Fraktur ist posttraumatisch entsprechend ein Konzentrationsanstieg zu erwarten. Sowohl beim Menschen (Lee et al. 2008) als auch im Tiermodell (Svensen 2004) ist

ein solcher Anstieg innerhalb der ersten 24 h nach Frakturierung bekannt. In der Maus *peakt* er im weiteren Verlauf am dritten Tag, bevor er wieder abfällt (Svensen 2004). Angaben in welchem Maße ein Konzentrationsanstieg im Rattenmodell üblich ist, konnte in der Literatur nicht ausfindig gemacht werden. Um einen Anhaltspunkt über den Standardlevel zu bekommen, wurde die Plasmakonzentration von VEGF bei einem gleichaltrigen Tier ohne jegliche Knochen- oder Rückenmarksverletzung bestimmt. Auf dem Niveau dieses Tieres befanden sich beide Gruppen an Tag 14. Die Kontrollgruppe zeigte zuvor tendenziell einen *Peak* an Tag 7, während sich die Konzentration in der Paraplegie-Gruppe unverändert darstellte. Falls postoperativ überhaupt eine Steigerung der VEGF-Menge vorhanden war, ist sie in der Paraplegie-Gruppe bereits bis Tag 3 wieder auf das ursprüngliche Niveau abgesunken. Aufgrund fehlender Signifikanzen der Abweichungen zwischen den Gruppen und im Zeitverlauf, kann jedoch nicht sicher festgestellt werden, ob die Werte nicht innerhalb der üblichen individuellen Schwankungen liegen.

5.3 Inflammation

Die Entzündungsphase ist die erste Reaktion des Körpers auf die Verletzung des Weichteil- und Knochengewebes. Vor allem Makrophagen haben hierbei eine zentrale Stellung und sind nicht nur für den Abbau nekrotischen Gewebes zuständig, sondern auch Organisatoren vieler Vorgänge. Eine andauernde Monozytopenie verursacht beispielsweise eine verzögerte Fibroblasteneinwanderung und -proliferation (Leibovich and Ross 1975). Makrophagen sezernieren über hundert Substanzen, darunter PDGF, TGF- β , FGF und IGF (Nathan 1987), außerdem angiogenesestimulierende Faktoren (Glowacki 1998). Somit produzieren sie alle wichtigen, an der Reparation beteiligten Faktoren (Wong and Wahl 1990).

Die Beurteilung eingewanderter Makrophagen anhand der immunhistochemischen Färbung zum Nachweis des CD68-Antigens ist eine anerkannte und häufig verwendete Methode. Zwar werden teilweise in geringem Maße auch andere Zellen angefärbt (Pulford et al. 1990), trotzdem ist das Antigen in der Forschung allgemein als Makrophagenmarker bekannt (Apovian et al. 2008; Bremer et al. 2009; Gyawali et al. 2010). Osteoklasten im Defektspalt, die sich an der Oberfläche des neugebildeten Knochens befanden, wurden jedoch ebenfalls und mit gleicher Intensität markiert. Eine große Anzahl an Osteoklasten bei Tieren mit

Knochengewebe hätte die Aussage über eingewanderte Makrophagen im Vergleich zu Tieren ohne Knochen daher verfälscht. Aus diesem Grunde wurden Knochen- und Knorpelareale, einschließlich der anhaftenden Osteoklasten, von der Auswertung ausgeschlossen. Es wurden so lediglich die verbleibenden und in kleiner Anzahl vorliegenden mehrkernigen Riesenzellen im weichen Kallusgewebe berücksichtigt und eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse konnte gewährleistet werden. Die anteilige Fläche von CD68-positiven Zellen am Regenerationsgewebe wurde quantitativ an Tag 7 und Tag 14 bestimmt. Nach einer Standzeit von 3 Tagen befand sich kaum Gewebe im Defektspace. Die stattdessen vorhandene, seröse Flüssigkeit färbte sich rötlich und konnte bei der Flächenberechnung der CD68-positiven Zellen nicht über Thresholdeinstellungen ausgeschlossen werden, was eine quantitative Bestimmung der Makrophagen im Defektspace zu diesem Zeitpunkt nicht ermöglichte. Stattdessen erfolgte eine qualitative Beurteilung. Diese zeigte an Tag 3 bei beiden Gruppen eine sehr geringe Anzahl an Entzündungszellen im Defektspace. Makrophagen lagen üblicherweise nur im Granulationsgewebe vor, dessen Entwicklung jedoch an Tag 3 noch kaum vorhanden war. Die initiale Entzündungsreaktion wird demnach von Zellen aktiviert, die sich zunächst nur im umliegenden Gewebe aufhalten. Um quantitative Gruppenunterschiede in der frühen Phase aufzudecken, sollte dieser Bereich genauer betrachtet werden.

Die inflammatorische Phase der Frakturheilung beginnt mit dem Einwirken des Traumas (Sfeir et al. 2005). In Folge von Rupturen der Zellmembranen wird Arachidonsäure freigesetzt, die durch die Cyclooxygenase zu Prostaglandin umgesetzt wird (Probst and Spiegel 1997) und die entzündliche Reaktion vermittelt. Nach und nach wandern Makrophagen in das verletzte Gebiet ein, weshalb ein deutlicher Anstieg von Tag 3 bis Tag 7 zu erwarten war und auch histologisch nachvollzogen werden konnte. Üblicherweise sind neutrophile Granulozyten die ersten Zellen, die in eine Wunde einwandern (Simpson and Ross 1972). Da es sich hier jedoch um eine sterile operative Wunde handelt, waren nur in zwei Fällen vereinzelt Granulozyten zu finden.

Nach 7 Tagen ist die inflammatorische Phase fast vollständig abgeschlossen (Sfeir et al. 2005), weshalb es folgend keine weitere Erhöhung geben sollte und die stagnierende Makrophagenzahl in der Kontrollgruppe zwischen den letzten beiden Untersuchungszeitpunkten einleuchtet. Der signifikante Anstieg in der Paraplegie-Gruppe an Tag 14 ist dagegen erstaunlich. Auf den ersten Blick scheint in Verbindung mit einem

Rückenmarkstrauma eine verzögert beginnende, aber verstärkte Entzündungsreaktion abzulaufen. Solch eine starke Entzündungsphase könnte in der Lage sein, eine vermehrte Knochenbildung bzw. eine schnellere Spaltüberbrückung zu verursachen, da durch Zellen der Inflammation die allgemeinen Heilungsabläufe aktiviert und organisiert werden. Demnach werden bei einer großen Anzahl vorliegender Entzündungszellen auch viele Wachstumsfaktoren freigesetzt, die den Heilungsvorgang stimulieren und beschleunigen. Die beobachtete verstärkte inflammatorische Reaktion in der Paraplegie-Gruppe tritt jedoch erst an Tag 14 auf. Zu diesem Zeitpunkt sind zwischen den Gruppen bereits Unterschiede bezüglich der gebildeten Knochenmenge ersichtlich, so dass eine ursächliche Beteiligung der Entzündungsreaktion hieran unwahrscheinlich erscheint.

Als Ursache für die spätere Entzündung wäre die Aktivität der Tiere denkbar. Kontrolltiere sind in der Lage unmittelbar nach der Operation umherzulaufen, zwar mit einer rigiden Fixierung des Knochens, aber dennoch mit Bewegungen des umliegenden Weichteilgewebes. Paraplegische Tiere dagegen zeigen eine schlaffe Lähmung ohne jegliche Bewegung der Hintergliedmaße. Im Verlauf der neuronalen Regeneration kehren zwischen 7 und 14 Tagen postoperativ zunehmend motorische Fähigkeiten zurück, was anhand des BBB-Score-Verlaufs nachvollzogen werden kann (Abb. 17). Die beginnende muskuläre Bewegung in einem durch den Eingriff traumatisierten Bereich, könnte einen zweiten Entzündungsschub erklären, der zuvor ohne Bewegungsreize ausgeblieben bzw. nur vermindert abgelaufen ist.

Allerdings erreichen die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zu keinem der Zeitpunkte das Signifikanzniveau, weshalb lediglich von Tendenzen gesprochen werden kann und die Inflammation ggf. überhaupt keinen Einfluss auf die nachgewiesene, veränderte Knochenbildung hat. Zu überlegen ist daher auch die Möglichkeit einer Verdrängung von Granulationsgewebe mit den darin enthaltenen Makrophagen durch den neugebildeten Knochen an Tag 14. Paraplegische Tiere bildeten mehr Knochen im Defektspace. Dieser könnte das lockere Granulationsgewebe mit zunehmender Größe auf eine kleinere Fläche zusammengedrückt haben. So wäre die gleiche Anzahl Makrophagen auf einer wesentlich kleineren Fläche vorhanden, was den prozentualen Anteil der Zellen am Gewebe rechnerisch erhöht hätte und so zu den beobachteten Unterschieden zwischen den Gruppen an Tag 14 geführt haben könnte.

5.4 Osteogenese

Der ursprüngliche Verdacht, Veränderungen der Angiogenese und Inflammation wären die Ursache für eine verstärkte Knochenheilung, konnte in der vorliegenden Arbeit mit den verwendeten Methoden nicht nachgewiesen werden. Wie auch in der Vorstudie offenbarte sich jedoch bei paraplegischen Tieren eine größere Menge neugebildeter Knochen im Defektspalt. An Tag 14 hatten fünf von sechs Tieren mit der Produktion von Knochengewebe begonnen, während es in der Kontrollgruppe nur zwei von sechs waren. Der mittlere Score der semiquantitativen Auswertung entsprach bei paraplegischen Tieren mehr als dem Doppelten der Kontrollen (Faktor 2,1). Diese Studie bestätigt damit die Ergebnisse der Vorstudie: das Vorliegen einer neurologischen Läsion induziert zu einem früheren Zeitpunkt die Bildung von Knochengewebe.

Trotz frühem Beginn der Osteogenese, schien das Ausmaß der Knochenformation in dieser Studie tendenziell eher gering zu sein. Andere Forschungsgruppen beobachten die komplette Überbrückung eines Knochendefektes ähnlicher Größe im Rattenmodell in einer relativ kurzen Zeitspanne. So werden zylindrische Knochendefekte im Femur mit einem Durchmesser von 2,2 mm innerhalb von 4 Wochen bzw. 2 mm innerhalb von 30 Tagen vollständig mit Knochengewebe aufgefüllt (Blaya et al. 2008; Miron et al. 2013). In diesen OP-Modellen ist zu bedenken, dass die Knochenneubildung von allen Seiten des Defekts gleichzeitig beginnt. Dennoch kann auch bei segmentalen Knochendefekten, bei denen der Spalt nur von zwei Seiten mit Knochengewebe aufgefüllt wird, eine Verbindung der Defektenden innerhalb von 4 Wochen erreicht werden (Mehta et al. 2012; Skaliczki et al. 2012). Demgegenüber scheint die Heilung, die in der Kontrollgruppe zum großen Teil nach 14 Tagen noch nicht einmal begonnen hatte, leicht vermindert zu sein. Bekanntlich werden Art der Heilung sowie zeitlicher Verlauf durch die Stabilität des Fixierungsmechanismus beeinflusst (Montjovent et al. 2013). In der vorliegenden Studie wurde eine winkelstabile Osteosyntheseplatte verwendet, um der unterschiedlichen Bewegungsintensität der Gruppen Rechnung zu tragen (siehe 5.1 Knochen- und Frakturmodelle). Mit der Verwendung eines solchen, vollständig rigiden Systems werden Entzündungsmechanismen in geringerem Maße stimuliert, was zu einer verminderten Ausschüttung von Wachstumsfaktoren (Probst and Spiegel 1997), einer desmalen Ossifikation (Rontgen et al. 2010) und einem kleineren Kallus führt. Flexiblere Systeme lassen stärkere Entzündungsreaktionen zu, der Bildung von Gefäßen wird jedoch entgegengewirkt. So kommt es zu einem hypoxischen Milieu mit folgender

Knorpelbildung (enchondrale Ossifikation) (Probst and Spiegel 1997) und Formation eines wesentlich größeren aber überwiegend aus Knorpel bestehenden Kallus (Rontgen et al. 2010). Skaliczki et al. (2012) und Mehta et al. (2012) verwendeten insgesamt 4 Schrauben zur Stabilisierung, während in dieser Studie 6 Schrauben verwendet wurden. Aufgrund der daraus folgenden stabileren Fixierung kann wohl die unterschiedliche Heilungszeit begründet werden. Das Fehlen von Knorpelgewebe und die vergleichsweise geringen Mengen an gebildetem Knochen sind demnach Erfolgsanzeichen des in dieser Studie verwendeten winkelstabilen Systems. Abgesehen davon können die Auswirkungen des Modells auf die Knochenbildung ohnehin vernachlässigt werden, da nicht die absolute Knochenmenge untersucht wurde, sondern die Folgen einer Rückenmarksschädigung auf die Osteogenese und somit die relative Knochenmenge im Vergleich zwischen den Gruppen. Durch die gleiche Behandlung beider Gruppen wirkte sich der Einfluss des Stabilisierungssystems bei allen Tieren im gleichen Maße aus. Die erzeugten Unterschiede zwischen den Gruppen wurden demnach alleine durch den Einfluss der Rückenmarksverletzung verursacht.

Als Marker der Knochenformation wurde die knochenspezifische alkalische Phosphatase (BALP) im Plasma bestimmt. Da die Konzentration der Gesamt-ALP sich hauptsächlich aus der knochenspezifischen und der leberspezifischen ALP zusammensetzt, wird sie auch durch skelettunabhängige Faktoren beeinflusst. Eine spezifische Aussage ermöglicht demnach nur die Menge der BALP. Sie wird von aktiven Osteoblasten synthetisiert und dient als Indikator für Knochenformationen (Moss 1987; Hyldstrup et al. 1988; Oni et al. 1989). In Folge einer Knochenverletzung steigt die Blutkonzentration im Vergleich zu Kontrollpatienten stark an und bleibt beim Menschen über Wochen erhöht (Leung et al. 1993). Auch in Tiermodellen kann ein solcher Anstieg nachgewiesen werden (Seebeck et al. 2005; Peng et al. 2010).

Der Konzentrationsverlauf der BALP scheint speziesspezifisch zu variieren. Im Menschen peakt die Konzentration nach 8-12 Wochen (Leung et al. 1993), beim Schaf bereits nach 3 Wochen (Seebeck et al. 2005) und in einer Kaninchenstudie fand man die höchste Konzentrationen nach 7 Tagen (Peng et al. 2010). Hinweise bezüglich Konzentrationsverläufe in der Ratte waren in der Literatur nicht zu finden und konnten aufgrund der verschiedenen zeitlichen Konzentrationsmuster auch nicht von einer anderen Tierart übertragen werden. Um einen Vergleichswert und Anhaltspunkt auch für das Rattenmodell zu bekommen, wurde, entsprechend der VEGF-Bestimmung, auch für BALP der basale Wert eines Tieres ohne Knochen- und Rückenmarksverletzung bestimmt.

Im zeitlichen Verlauf fiel bei Tieren mit Rückenmarksverletzung die Konzentration signifikant vom dritten bis zum vierzehnten Tag ab. Hierbei könnte es sich um einen durch den Eingriff verursachten *Peak* der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase handeln, der an oder bereits vor Tag 3 seinen Höhepunkt erreicht und bis Tag 14 wieder auf das Niveau des unoperierten Tieres absinkt. Ebenfalls signifikant unterschieden sich die Konzentrationen zwischen den Gruppen an Tag 14. Es ist anzunehmen, dass der Kurvenverlauf bei paraplegischen Tieren zeitlich nach vorne verschoben ist, was zu den histologischen Ergebnissen bezüglich der Knochenbildung passen würde. Die Konzentrationen an Tag 3 waren vergleichbar mit denen der Kontrollen an Tag 7. Ebenso verhielt es sich mit Tag 7 und Tag 14. Demzufolge schien die BALP-Menge bei Kontrolltieren innerhalb der ersten Woche kontinuierlich anzusteigen und erst danach abzusinken, während Tiere mit Rückenmarksverletzung einen *Peak* zu einem früheren Zeitpunkt zeigten. Für eine bessere Interpretation der Daten wäre eine zusätzliche Messung der Konzentrationen an Tag 21 interessant gewesen. So hätte der Kurvenverlauf der Kontrollen verfolgt werden können, um zu beurteilen, ob der Plasmaspiegel ebenfalls auf das Niveau des unoperierten Tieres abfällt.

5.5 Fazit

Die zugrunde liegende Ursache der veränderten Knochenbildung in Verbindung mit neurologischen Läsionen konnte mit den verwendeten Methoden in dieser Studie nicht abschließend aufgeklärt werden. Sowohl Ergebnisse der Histologie-, als auch der VEGF-Auswertung zeigten keine Unterschiede bezüglich der Gefäßneubildung zwischen den beiden Gruppen auf. Die Angiogenese scheint demnach nicht Ursache der vermehrten Kallusbildung zu sein. Auch die vorliegenden Ergebnisse der CD68-Färbung können nicht eindeutig die Inflammation als Verursacher identifizieren. Aufgrund des signifikanten Anstiegs der Makrophagenanzahl an Tag 14 in der Paraplegie-Gruppe sollte die Entzündungsreaktion jedoch Gegenstand weiterer Untersuchungen werden. Hier könnte als auszuwertender Bereich das dem Defektspace benachbarte Gewebe gewählt werden, um die hier vorhandenen Makrophagen auch an Tag 3 quantifizieren zu können.

Zwar konnte der Pathomechanismus in dieser Studie nicht aufgedeckt werden, jedoch wurden die Ergebnisse der Vorstudie bestätigt. Die zeitlichen Konzentrationsmuster der BALP und der histologische Nachweis vermehrten Knochengewebes nach 14 Tagen beweisen eine gesteigerte Osteogenese bei Knochenverletzungen in Verbindung mit einem spinalen Trauma.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde die Knochenheilung nach Rückenmarkstrauma im Rattenmodell untersucht, um Ursachen für die in der Humanmedizin beobachteten Effekte einer gesteigerten Kallusbildung nach neurologischer Schädigung aufzudecken.

Hierfür wurde in insgesamt 33 weiblichen Sprague – Dawley Ratten ein femoraler Knochendefekt standardisierter Größe angelegt, der mit Hilfe einer Plattenosteosynthese stabilisiert wurde. Je nach Gruppenzugehörigkeit wurde bei der Hälfte der Tiere zusätzlich eine Rückenmarkskontusion im midthorakalen Bereich durchgeführt, welche zu einer vollständigen Paraplegie führte. Die Knochendefektheilung wurde 3, 7 und 14 Tage nach den operativen Eingriffen hinsichtlich angiogenese- und inflammationsrelevanter Faktoren untersucht.

Im Zuge der Euthanasie wurden die operierten Hinterextremitäten mit einem Röntgenkontrastmittel perfundiert und neugebildete Gefäße mit Hilfe eines Mikro-CTs ausgewertet. Zusätzlich wurden axiale, histologische Schnitte aus der Femurmitte angefertigt und mit einer HE-Färbung Gefäßanzahl und Knochen- bzw. Knorpelbildung im Defektspace ermittelt. Anhand einer immunhistochemischen Färbung zum Nachweis CD68-positiver Zellen konnte der Verlauf der Makrophageneinwanderung beurteilt werden. Plasmaproben wurden auf Konzentrationen von VEGF und BALP untersucht.

In dieser Studie wurde aufgezeigt, dass eine erhöhte Knochenbildungsneigung in Tieren mit gleichzeitiger Knochen- und ZNS-Läsion besteht. Die zugrundeliegende Ursache konnten jedoch mit den verwendeten Methoden nicht abschließend aufgedeckt werden.

Die Angiogenese scheint bei dem Vorgang unbeeinträchtigt zu sein. Ergebnisse der Gefäßauswertung mit Hilfe des Mikro-CTs zeigten keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Zwar müssen die Methode der Perfusion und entsprechend die Aussagekraft der Mikro-CT-Ergebnisse aufgrund verschiedener Auffälligkeiten hinterfragt werden, jedoch deckten auch die histologischen Untersuchungen und die VEGF-Bestimmung keine Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Ebenso lässt der Makrophagenanteil im Granulationsgewebe des Defektspace keinen sicheren Rückschluss auf eine ursächliche Beteiligung inflammationsrelevanter Mechanismen zu. Zwar gab es einen signifikanten Anstieg von Makrophagen in der Paraplegie-Gruppe zwischen den beiden letzten

Untersuchungszeitpunkten, jedoch ergaben sich keine Signifikanzen im Gruppenvergleich. Um den genauen Pathomechanismus der gesteigerten Knochenbildung aufzuklären, sind demnach weitere Untersuchungen nötig.

7. Summary

In the present study bone healing after spinal cord injury has been investigated in a rat model in order to evaluate underlying mechanisms of increased osteogenic activity – a phenomenon which is well known in human medicine.

In 33 female Sprague-Dawley rats bone healing of a femoral defect was investigated. A standardized osteotomy was conducted and stabilized by an internal fixation composed of a plate and screws. Additionally, half of the animals received a midthoracic spinal cord contusion leading to complete paraplegia. Bone defects were extracted after 3, 7 or 14 days after surgery and analyzed with regard to angiogenesis and inflammation.

Hindlimbs were perfused with a radio-opaque substance and newly built vessels were evaluated using a micro-CT. Additionally, axial histological sections of the femur were produced and stained with hematoxylin-eosin in order to determine the amount of vessels as well as the existence of cartilage, and of bone tissue respectively in the defect gap. By means of an immunohistochemical ED1 antibody staining the amount of CD68-positive cells in the granulation tissue of the gap was ascertained, while the concentration of VEGF and BALP was measured in plasma samples.

The present study has demonstrated an increased tendency towards bone formation in animals with simultaneous traumata of bone and CNS, but the mechanisms responsible for this phenomenon couldn't be identified by means of the presently used investigation techniques. Angiogenesis does not seem to be involved in the process. The perfusion-method and subsequent results obtained with micro-CT are critical due to methodological artefacts, but also histological examination and evaluation of VEGF-concentration could not reveal any notable differences between the groups. Moreover, the ratio of macrophages located in the granulation tissue of the gap does not reveal an etiological involvement of inflammation-related processes. Though a significant increase of macrophages was observed in paraplegic animals between the 7th and 14th day of examination, there were no significant differences between the groups. Therefore, additional investigations are necessary in order to clarify the exact pathomechanism of the increased osteogenic activity due to spinal cord injury.

8. Literaturverzeichnis

- Abel R., Meiners T. and Gerner H.J. (2002). "Die Resektion von heterotopen Ossifikationen des Hüftgelenks Querschnittsgelähmter." Operat Orthop Traumatol **14**: 16 - 28.
- Aerssens J., Boonen S., Lowet G. and Dequeker J. (1998). "Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research." Endocrinology **139**(2): 663-670.
- Ahn J., Serrano de la Pena L., Shore E.M. and Kaplan F.S. (2003). "Paresis of a bone morphogenetic protein-antagonist response in a genetic disorder of heterotopic skeletogenesis." J Bone Joint Surg Am **85-A**(4): 667-674.
- Akbar M., Seyler T.M., Abel R. and Gerner H.J. (2007). "Heterotope Ossifikation bei Querschnittslähmung und Schädel-Hirn-Trauma." Phys Med Rehab Kuror **17**: 156-171.
- Aldridge S.E., Lennard T.W., Williams J.R. and Birch M.A. (2005). "Vascular endothelial growth factor receptors in osteoclast differentiation and function." Biochem Biophys Res Commun **335**(3): 793-798.
- Alt V., Kogelmaier D.V., Lips K.S., Witt V., Pacholke S., Heiss C., Kampschulte M., Heinemann S., Hanke T., Thormann U., Schnettler R. and Langheinrich A.C. (2011). "Assessment of angiogenesis in osseointegration of a silica-collagen biomaterial using 3D-nano-CT." Acta Biomater **7**(10): 3773-3779.
- Andermahr J., Elsner A., Brings A.E., Hensler T., Gerbershagen H. and Jubel A. (2006). "Reduced collagen degradation in polytraumas with traumatic brain injury causes enhanced osteogenesis." J Neurotrauma **23**(5): 708-720.
- Apovian C.M., Bigornia S., Mott M., Meyers M.R., Ulloor J., Gagua M., McDonnell M., Hess D., Joseph L. and Gokce N. (2008). "Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(9): 1654-1659.
- Arnett T.R., Gibbons D.C., Utting J.C., Orriss I.R., Hoebertz A., Rosendaal M. and Meghji S. (2003). "Hypoxia is a major stimulator of osteoclast formation and bone resorption." J Cell Physiol **196**(1): 2-8.
- Aro H. (1985). "Effect of nerve injury on fracture healing. Callus formation studied in the rat." Acta Orthop Scand **56**(3): 233-237.
- Aubut J.A., Mehta S., Cullen N. and Teasell R.W. (2011). "A comparison of heterotopic ossification treatment within the traumatic brain and spinal cord injured population: An evidence based systematic review." NeuroRehabilitation **28**(2): 151-160.
- Augustin G., Antabak A. and Davila S. (2007). "The periosteum. Part 1: Anatomy, histology and molecular biology." Injury **38**(10): 1115-1130.

- Barnes G.L., Kostenuik P.J., Gerstenfeld L.C. and Einhorn T.A. (1999). "Growth factor regulation of fracture repair." J Bone Miner Res **14**(11): 1805-1815.
- Bassett C.A. and Herrmann I. (1961). "Influence of oxygen concentration and mechanical factors on differentiation of connective tissues in vitro." Nature **190**: 460-461.
- Basso D.M., Beattie M.S. and Bresnahan J.C. (1995). "A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats." J Neurotrauma **12**(1): 1-21.
- Beausejour C. (2007). "Bone marrow-derived cells: the influence of aging and cellular senescence." Handb Exp Pharmacol(180): 67-88.
- Beeton C.A., Brooks R.A., Chatfield D., Human M. and Rushton N. (2002). "Circulating levels of insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3 in patients with severe head injury." J Bone Joint Surg Br **84**(3): 434-439.
- Beeton C.A., Chatfield D., Brooks R.A. and Rushton N. (2004). "Circulating levels of interleukin-6 and its soluble receptor in patients with head injury and fracture." J Bone Joint Surg Br **86**(6): 912-917.
- Bergman R.J., Gazit D., Kahn A.J., Gruber H., McDougall S. and Hahn T.J. (1996). "Age-related changes in osteogenic stem cells in mice." J Bone Miner Res **11**(5): 568-577.
- Bidner S.M., Rubins I.M., Desjardins J.V., Zukor D.J. and Goltzman D. (1990). "Evidence for a humoral mechanism for enhanced osteogenesis after head injury." J Bone Joint Surg Am **72**(8): 1144-1149.
- Blaya D.S., Guimaraes M.B., Pozza D.H., Weber J.B. and de Oliveira M.G. (2008). "Histologic study of the effect of laser therapy on bone repair." J Contemp Dent Pract **9**(6): 41-48.
- Boes M., Kain M., Kakar S., Nicholls F., Cullinane D., Gerstenfeld L., Einhorn T.A. and Tornetta P., 3rd (2006). "Osteogenic effects of traumatic brain injury on experimental fracture-healing." J Bone Joint Surg Am **88**(4): 738-743.
- Bolander M.E. (1992). "Regulation of fracture repair by growth factors." Proc Soc Exp Biol Med **200**(2): 165-170.
- Boulet M. and Marier J.R. (1961). "Precipitation of calcium phosphates from solutions at near physiological concentrations." Arch Biochem Biophys **93.1**: 157 - 165.
- Bowman B.M. and Miller S.C. (1999). "Skeletal mass, chemistry, and growth during and after multiple reproductive cycles in the rat." Bone **25**(5): 553-559.
- Bremer J., Heikenwalder M., Haybaeck J., Tiberi C., Krautler N.J., Kurrer M.O. and Aguzzi A. (2009). "Repetitive immunization enhances the susceptibility of mice to peripherally administered prions." PLoS One **4**(9): e7160.

- Bresnahan J.C., Beattie M.S., Stokes B.T. and Conway K.M. (1991). "Three-dimensional computer-assisted analysis of graded contusion lesions in the spinal cord of the rat." J Neurotrauma **8**(2): 91-101.
- Bresnahan J.C., Beattie M.S., Todd F.D., 3rd and Noyes D.H. (1987). "A behavioral and anatomical analysis of spinal cord injury produced by a feedback-controlled impactation device." Exp Neurol **95**(3): 548-570.
- Brighton C.T., Schaffer J.L., Shapiro D.B., Tang J.J. and Clark C.C. (1991). "Proliferation and macromolecular synthesis by rat calvarial bone cells grown in various oxygen tensions." J Orthop Res **9**(6): 847-854.
- Brinker M.R. and Bailey D.E., Jr. (1997). "Fracture healing in tibia fractures with an associated vascular injury." J Trauma **42**(1): 11-19.
- Brownlow H.C., Reed A. and Simpson A.H. (2002). "The vascularity of atrophic non-unions." Injury **33**(2): 145-150.
- Buckwalter J.A. and al. e. "Healing of musculoskeletal tissues" in Rockwood and Green's Fractures in Adults. Rockwood C.A., Bucholz R.W., Green D.P., Court-Brown C., Heckman J.D. and Tornetta P. Philadelphia (1996), Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins: 261-304.
- Cadosch D., Toffoli A.M., Gautschi O.P., Frey S.P., Zellweger R., Skirving A.P. and Filgueira L. (2010). "Serum after traumatic brain injury increases proliferation and supports expression of osteoblast markers in muscle cells." J Bone Joint Surg Am **92**(3): 645-653.
- Chalmers J., Gray D.H. and Rush J. (1975). "Observations on the induction of bone in soft tissues." J Bone Joint Surg Br **57**(1): 36-45.
- Chantraine A. and Minaire P. (1981). "Para-osteo-arthropathies. A new theory and mode of treatment." Scand J Rehabil Med **13**(1): 31-37.
- Cipriano C.A., Pill S.G. and Keenan M.A. (2009). "Heterotopic ossification following traumatic brain injury and spinal cord injury." J Am Acad Orthop Surg **17**(11): 689-697.
- Citta-Pietrolungo T.J., Alexander M.A. and Steg N.L. (1992). "Early detection of heterotopic ossification in young patients with traumatic brain injury." Arch Phys Med Rehabil **73**(3): 258-262.
- Comarr A.E., Hutchinson R.H. and Bors E. (1962). "Extremity fractures of patients with spinal cord injuries." Am J Surg **103**: 732-739.
- Cope R. (1990). "Heterotopic ossification." South Med J **83**(9): 1058-1064.
- Dai J. and Rabie A.B. (2007). "VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification." J Dent Res **86**(10): 937-950.

- Damanski M. (1961). "Heterotopic ossification in paraplegia: a clinical study." J Bone Joint Surg Br **43B**: 286-299.
- Deckers M.M., van Bezooijen R.L., van der Horst G., Hoogendam J., van Der Bent C., Papapoulos S.E. and Lowik C.W. (2002). "Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A." Endocrinology **143**(4): 1545-1553.
- Dickson K.F., Katzman S. and Paiement G. (1995). "The importance of the blood supply in the healing of tibial fractures." Contemp Orthop **30**(6): 489-493.
- Ding W.G., Jiang S.D., Zhang Y.H., Jiang L.S. and Dai L.Y. (2011). "Bone loss and impaired fracture healing in spinal cord injured mice." Osteoporos Int **22**(2): 507-515.
- Donneys A., Tchanque-Fossuo C.N., Farberg A.S., Deshpande S.S. and Buchman S.R. (2012). "Bone regeneration in distraction osteogenesis demonstrates significantly increased vascularity in comparison to fracture repair in the mandible." J Craniofac Surg **23**(1): 328-332.
- Donneys A., Tchanque-Fossuo C.N., Farberg A.S., Jing X.L., Deshpande S.S., Goldstein S.A. and Buchman S.R. (2011). "Quantitative analysis of vascular response after mandibular fracture repair using microcomputed tomography with vessel perfusion." Plast Reconstr Surg **127**(4): 1487-1493.
- Draper W.E., Schubert T.A., Clemmons R.M. and Miles S.A. (2012). "Low-level laser therapy reduces time to ambulation in dogs after hemilaminectomy: a preliminary study." J Small Anim Pract **53**(8): 465-469.
- Eichenholtz S.N. (1963). "Management of long-bone fractures in paraplegic patients." J Bone Joint Surg **45-A**: 299-310.
- Eidelberg E., Staten E., Watkins J.C., McGraw D. and McFadden C. (1976). "A model of spinal cord injury." Surg Neurol **6**(1): 35-38.
- Einhorn T.A. (1998). "The cell and molecular biology of fracture healing." Clin Orthop Relat Res(355 Suppl): S7-21.
- Ekelund A., Brosjo O. and Nilsson O.S. (1991). "Experimental induction of heterotopic bone." Clin Orthop Relat Res(263): 102-112.
- Engsig M.T., Chen Q.J., Vu T.H., Pedersen A.C., Therkidsen B., Lund L.R., Henriksen K., Lenhard T., Foged N.T., Werb Z. and Delaisse J.M. (2000). "Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones." J Cell Biol **151**(4): 879-889.
- Evans K.N., Forsberg J.A., Potter B.K., Hawksworth J.S., Brown T.S., Andersen R., Dunne J.R., Tadaki D. and Elster E.A. (2012). "Inflammatory cytokine and chemokine expression is associated with heterotopic ossification in high-energy penetrating war injuries." J Orthop Trauma **26**(11): e204-213.

- Feldman G., Li M., Martin S., Urbanek M., Urtizberea J.A., Fardeau M., LeMerrer M., Connor J.M., Triffitt J., Smith R., Muenke M., Kaplan F.S. and Shore E.M. (2000). "Fibrodysplasia ossificans progressiva, a heritable disorder of severe heterotopic ossification, maps to human chromosome 4q27-31." Am J Hum Genet **66**(1): 128-135.
- Ferguson C., Alpern E., Miclau T. and Helms J.A. (1999). "Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation?" Mech Dev **87**(1-2): 57-66.
- Ferrara N. and Davis-Smyth T. (1997). "The biology of vascular endothelial growth factor." Endocr Rev **18**(1): 4-25.
- Fong G.H. (2009). "Regulation of angiogenesis by oxygen sensing mechanisms." J Mol Med (Berl) **87**(6): 549-560.
- Forster Y., Gao W., Demmrich A., Hempel U., Hofbauer L.C. and Rammelt S. (2013). "Monitoring of the first stages of bone healing with microdialysis." Acta Orthop **84**(1): 76-81.
- Friedenstein A.J., Petrakova K.V., Kurolesova A.I. and Frolova G.P. (1968). "Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues." Transplantation **6**(2): 230-247.
- Garland D.E. (1988). "Clinical observations on fractures and heterotopic ossification in the spinal cord and traumatic brain injured populations." Clin Orthop Relat Res **233**: 86 - 101.
- Garland D.E. (1991). "A clinical perspective on common forms of acquired heterotopic ossification." Clin Orthop Relat Res(263): 13-29.
- Gautschi O.P., Cadosch D., Frey S.P., Skirving A.P., Filgueira L. and Zellweger R. (2009). "Serum-mediated osteogenic effect in traumatic brain-injured patients." ANZ J Surg **79**(6): 449-455.
- Gautschi O.P., Toffoli A.M., Joesbury K.A., Skirving A.P., Filgueira L. and Zellweger R. (2007). "Osteoinductive effect of cerebrospinal fluid from brain-injured patients." J Neurotrauma **24**(1): 154-162.
- Gerstenfeld L.C., Cullinane D.M., Barnes G.L., Graves D.T. and Einhorn T.A. (2003). "Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation." J Cell Biochem **88**(5): 873-884.
- Giannoudis P., Psarakis S. and Kontakis G. (2007). "Can we accelerate fracture healing? A critical analysis of the literature." Injury **38 Suppl 1**: S81-89.
- Giannoudis P.V., Tzioupis C.C. and Tsiridis E. (2006). "Gene therapy in orthopaedics." Injury **37 Suppl 1**: S30-40.
- Glowacki J. (1998). "Angiogenesis in fracture repair." Clin Orthop Relat Res(355 Suppl): S82-89.

- Gotz W., Reichert C., Canullo L., Jager A. and Heinemann F. (2012). "Coupling of osteogenesis and angiogenesis in bone substitute healing - a brief overview." Ann Anat **194**(2): 171-173.
- Granger N., Blamires H., Franklin R.J. and Jeffery N.D. (2012). "Autologous olfactory mucosal cell transplants in clinical spinal cord injury: a randomized double-blinded trial in a canine translational model." Brain **135**(Pt 11): 3227-3237.
- Granger N., Chew D., Fairhurst P., Fawcett J.W., Lacour S.P., Craggs M., Mosse C.A., Donaldson N. and Jeffery N.D. (2013). "Use of an implanted sacral nerve stimulator to restore urine voiding in chronically paraplegic dogs." J Vet Intern Med **27**(1): 99-105.
- Gruner J.A. (1992). "A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat." J Neurotrauma **9**(2): 123-126; discussion 126-128.
- Grunewald V., Bhadra N., Creasey G.H. and Mortimer J.T. (1998). "Functional conditions of micturition induced by selective sacral anterior root stimulation: experimental results in a canine animal model." World J Urol **16**(5): 329-336.
- Guizar-Sahagun G., Grijalva I., Madrazo I., Franco-Bourland R., Salgado H., Ibarra A., Oliva E. and Zepeda A. (1994). "Development of post-traumatic cysts in the spinal cord of rats-subjected to severe spinal cord contusion." Surg Neurol **41**(3): 241-249.
- Gyawali D., Nair P., Zhang Y., Tran R.T., Zhang C., Samchukov M., Makarov M., Kim H.K. and Yang J. (2010). "Citric acid-derived in situ crosslinkable biodegradable polymers for cell delivery." Biomaterials **31**(34): 9092-9105.
- Hagen E.M., Faerstrand S., Hoff J.M., Rekand T. and Gronning M. (2011). "Cardiovascular and urological dysfunction in spinal cord injury." Acta Neurol Scand Suppl(191): 71-78.
- Hannallah D., Peng H., Young B., Usas A., Gearhart B. and Huard J. (2004). "Retroviral delivery of Noggin inhibits the formation of heterotopic ossification induced by BMP-4, demineralized bone matrix, and trauma in an animal model." J Bone Joint Surg Am **86-A**(1): 80-91.
- Harry L.E., Sandison A., Pearse M.F., Paleolog E.M. and Nanchahal J. (2009). "Comparison of the vascularity of fasciocutaneous tissue and muscle for coverage of open tibial fractures." Plast Reconstr Surg **124**(4): 1211-1219.
- Hayes K.C. and Kakulas B.A. (1997). "Neuropathology of human spinal cord injury sustained in sports-related activities." J Neurotrauma **14**(4): 235-248.
- Heiner D.E., Meyer M.H., Frick S.L., Kellam J.F., Fiechtl J. and Meyer R.A., Jr. (2006). "Gene expression during fracture healing in rats comparing intramedullary fixation to plate fixation by DNA microarray." J Orthop Trauma **20**(1): 27-38.
- Hicks S.P. and D'Amato C.J. (1975). "Motor-sensory cortex-corticospinal system and developing locomotion and placing in rats." Am J Anat **143**(1): 1-42.

- Histing T., Garcia P., Holstein J.H., Klein M., Matthys R., Nuetzi R., Steck R., Laschke M.W., Wehner T., Bindl R., Recknagel S., Stuermer E.K., Vollmar B., Wildemann B., Lienau J., Willie B., Peters A., Ignatius A., Pohlemann T., Claes L. and Menger M.D. (2011). "Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting." Bone **49**(4): 591-599.
- Histing T., Holstein J.H., Garcia P., Matthys R., Kristen A., Claes L., Menger M.D. and Pohlemann T. (2009). "Ex vivo analysis of rotational stiffness of different osteosynthesis techniques in mouse femur fracture." J Orthop Res **27**(9): 1152-1156.
- Hofmann G. and Röhl K. (2010). "Rückenmarkverletzungen und Querschnittslähmung." Trauma und Berufskrankheit **12.3**: 145-146.
- Hollinger J. and Wong M.E. (1996). "The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **82**(6): 594-606.
- Holstein J.H., Garcia P., Histing T., Kristen A., Scheuer C., Menger M.D. and Pohlemann T. (2009). "Advances in the establishment of defined mouse models for the study of fracture healing and bone regeneration." J Orthop Trauma **23**(5 Suppl): S31-38.
- Hyldstrup L., Clemmensen I., Jensen B.A. and Transbol I. (1988). "Non-invasive evaluation of bone formation: measurements of serum alkaline phosphatase, whole body retention of diphosphonate and serum osteocalcin in metabolic bone disorders and thyroid disease." Scand J Clin Lab Invest **48**(7): 611-619.
- Jiang S.D., Jiang L.S. and Dai L.Y. (2007). "Effects of spinal cord injury on osteoblastogenesis, osteoclastogenesis and gene expression profiling in osteoblasts in young rats." Osteoporos Int **18**(3): 339-349.
- Kalfas I.H. (2001). "Principles of bone healing." Neurosurg Focus **10**(4): E1.
- Kanczler J.M. and Oreffo R.O. (2008). "Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone." Eur Cell Mater **15**: 100-114.
- Kaplan F.S., Glaser D.L., Hebela N. and Shore E.M. (2004). "Heterotopic ossification." J Am Acad Orthop Surg **12**(2): 116-125.
- Khan M. and Griebel R. (1983). "Acute spinal cord injury in the rat: comparison of three experimental techniques." Can J Neurol Sci **10**(3): 161-165.
- Kivirikko K.I. and Prockop D.J. (1967). "Enzymatic hydroxylation of proline and lysine in protocollagen." Proc Natl Acad Sci U S A **57**(3): 782-789.
- Klein B.Y., Shohami E., Reikhshtein Y., Ben-Bassat H. and Liebergall M. (1999). "Serum-mediated osteogenic effects of head injury on cultured rat marrow stromal cells." Calcif Tissue Int **65**(3): 217-222.

- Knighton D.R., Hunt T.K., Scheuenstuhl H., Halliday B.J., Werb Z. and Banda M.J. (1983). "Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages." Science **221**(4617): 1283-1285.
- Knöfler E.W. (1967). "Die biomechanischen Induktionen bei der Knochenbruchheilung: Untersuchungen von Wechselwirkungen knochenbildender Gewebe in Zellkulturen." Beilageheft Zeitschrift für Orthopädie **104**: 1 - 95.
- Kobayashi N.R., Fan D.P., Giehl K.M., Bedard A.M., Wiegand S.J. and Tetzlaff W. (1997). "BDNF and NT-4/5 prevent atrophy of rat rubrospinal neurons after cervical axotomy, stimulate GAP-43 and Talphal-tubulin mRNA expression, and promote axonal regeneration." J Neurosci **17**(24): 9583-9595.
- Kwon B.K., Oxland T.R. and Tetzlaff W. (2002). "Animal models used in spinal cord regeneration research." Spine (Phila Pa 1976) **27**(14): 1504-1510.
- Langheinrich A.C., Michniewicz A., Sedding D.G., Walker G., Beighley P.E., Rau W.S., Bohle R.M. and Ritman E.L. (2006). "Correlation of vasa vasorum neovascularization and plaque progression in aortas of apolipoprotein E(-/-)/low-density lipoprotein(-/-) double knockout mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(2): 347-352.
- Laurnen E.L. and Kelly P.J. (1969). "Blood flow, oxygen consumption, carbon-dioxide production, and blood-calcium and pH changes in tibial fractures in dogs." J Bone Joint Surg Am **51**(2): 298-308.
- Lee D.Y., Cho T.J., Kim J.A., Lee H.R., Yoo W.J., Chung C.Y. and Choi I.H. (2008). "Mobilization of endothelial progenitor cells in fracture healing and distraction osteogenesis." Bone **42**(5): 932-941.
- Leibovich S.J. and Ross R. (1975). "The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum." Am J Pathol **78**(1): 71-100.
- Leung K.S., Fung K.P., Sher A.H., Li C.K. and Lee K.M. (1993). "Plasma bone-specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity." J Bone Joint Surg Br **75**(2): 288-292.
- Lu C., Saless N., Wang X., Sinha A., Decker S., Kazakia G., Hou H., Williams B., Swartz H.M., Hunt T.K., Miclau T. and Marcucio R.S. (2013). "The role of oxygen during fracture healing." Bone **52**(1): 220-229.
- Madison M. and Martin R.B. "Fracture healing" in Operative orthopaedics. Chapman M.W. and Madison M. Philadelphia (1993), Lippincott: 221-228.
- Major P., Resnick D. and Greenway G. (1980). "Heterotopic ossification in paraplegia: a possible disturbance of the paravertebral venous plexus." Radiology **136**(3): 797-799.
- Marreiros H., Loff C. and Calado E. (2012). "Osteoporosis in paediatric patients with spina bifida." J Spinal Cord Med **35**(1): 9-21.

- Martin S.H. and Bloedel J.R. (1973). "Evaluation of experimental spinal cord injury using cortical evoked potentials." J Neurosurg **39**(1): 75-81.
- Mehta M., Checa S., Lienau J., Hutmacher D. and Duda G.N. (2012). "In vivo tracking of segmental bone defect healing reveals that callus patterning is related to early mechanical stimuli." Eur Cell Mater **24**: 358-371; discussion 371.
- Mehta M., Strube P., Peters A., Perka C., Hutmacher D., Fratzl P. and Duda G.N. (2010). "Influences of age and mechanical stability on volume, microstructure, and mineralization of the fracture callus during bone healing: is osteoclast activity the key to age-related impaired healing?" Bone **47**(2): 219-228.
- Michelsson J.E., Granroth G. and Andersson L.C. (1980). "Myositis ossificans following forcible manipulation of the leg. A rabbit model for the study of heterotopic bone formation." J Bone Joint Surg Am **62**(5): 811-815.
- Michelsson J.E., Pettila M., Valtakari T., Leivo I. and Aho H.J. (1994). "Isolation of bone from muscles prevents the development of experimental callus-like heterotopic bone. A study of the interaction of bone and muscle in new bone formation." Clin Orthop Relat Res(302): 266-272.
- Michelsson J.E. and Rauschnig W. (1983). "Pathogenesis of experimental heterotopic bone formation following temporary forcible exercising of immobilized limbs." Clin Orthop Relat Res(176): 265-272.
- Milgram J.W. "Myositis ossificans and heterotopic bone" in Radiologic and Histologic Pathology of Nontumorous Diseases of Bones and Joints. Gruhn J. Illinois (1990), Northbrook Publishing Company: 454.
- Mills L.A. and Simpson A.H. (2012). "In vivo models of bone repair." J Bone Joint Surg Br **94**(7): 865-874.
- Miron R.J., Wei L., Bosshardt D.D., Buser D., Sculean A. and Zhang Y. (2013). "Effects of enamel matrix proteins in combination with a bovine-derived natural bone mineral for the repair of bone defects." Clin Oral Investig.
- Montjovent M.O., Siegrist M., Klenke F., Wetterwald A., Dolder S. and Hofstetter W. (2013). "Expression of antagonists of WNT and BMP signaling after non-rigid fixation of osteotomies." Bone **53**(1): 79-86.
- Morse L., Teng Y.D., Pham L., Newton K., Yu D., Liao W.L., Kohler T., Muller R., Graves D., Stashenko P. and Battaglino R. (2008). "Spinal cord injury causes rapid osteoclastic resorption and growth plate abnormalities in growing rats (SCI-induced bone loss in growing rats)." Osteoporos Int **19**(5): 645-652.
- Moss D.W. (1987). "Diagnostic aspects of alkaline phosphatase and its isoenzymes." Clin Biochem **20**(4): 225-230.
- Muzylak M., Price J.S. and Horton M.A. (2006). "Hypoxia induces giant osteoclast formation and extensive bone resorption in the cat." Calcif Tissue Int **79**(5): 301-309.

- Nathan C.F. (1987). "Secretory products of macrophages." J Clin Invest **79**(2): 319-326.
- Nauth A., Giles E., Potter B.K., Nesti L.J., O'Brien F P., Bosse M.J., Anglen J.O., Mehta S., Ahn J., Miclau T. and Schemitsch E.H. (2012). "Heterotopic ossification in orthopaedic trauma." J Orthop Trauma **26**(12): 684-688.
- Newman E., Turner A.S. and Wark J.D. (1995). "The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models." Bone **16**(4 Suppl): 277S-284S.
- Newman R.J., Stone M.H. and Mukherjee S.K. (1987). "Accelerated fracture union in association with severe head injury." Injury **18**(4): 241-246.
- Nishida H., Nakayama M., Tanaka H., Kitamura M., Hatoya S., Sugiura K., Suzuki Y., Ide C. and Inaba T. (2011). "Evaluation of transplantation of autologous bone marrow stromal cells into the cerebrospinal fluid for treatment of chronic spinal cord injury in dogs." Am J Vet Res **72**(8): 1118-1123.
- Noble L.J. and Wrathall J.R. (1985). "Spinal cord contusion in the rat: morphometric analyses of alterations in the spinal cord." Exp Neurol **88**(1): 135-149.
- Nyangoga H., Mercier P., Libouban H., Basle M.F. and Chappard D. (2011). "Three-dimensional characterization of the vascular bed in bone metastasis of the rat by microcomputed tomography (MicroCT)." PLoS One **6**(3): e17336.
- Oni O.O., Mahabir J.P., Iqbal S.J. and Gregg P.J. (1989). "Serum osteocalcin and total alkaline phosphatase levels as prognostic indicators in tibial shaft fractures." Injury **20**(1): 37-38.
- Orzel J.A. and Rudd T.G. (1985). "Heterotopic bone formation: clinical, laboratory, and imaging correlation." J Nucl Med **26**(2): 125-132.
- Orzel J.A., Rudd T.G. and Nelp W.B. (1984). "Heterotopic bone formation (myositis ossificans) and lower-extremity swelling mimicking deep-venous disease." J Nucl Med **25**(10): 1105-1107.
- Pape H.C., Lehmann U., van Griensven M., Gansslen A., von Glinski S. and Krettek C. (2001). "Heterotopic ossifications in patients after severe blunt trauma with and without head trauma: incidence and patterns of distribution." J Orthop Trauma **15**(4): 229-237.
- Parfitt A.M. "Bone remodelling - relationship to the amount and structure of bone and the pathogenesis and revention of fractures" in Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management. Riggs B.L. and Melton L.J. New York (1988), Lippincott-Raven: 45-93.
- Pearce A.I., Richards R.G., Milz S., Schneider E. and Pearce S.G. (2007). "Animal models for implant biomaterial research in bone: a review." Eur Cell Mater **13**: 1-10.
- Peck W.A. and Woods W.L. "The cells of bone" in Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management. Riggs B.L. and Melton L.J. New York (1988), Lippincott-Raven: 1-44.

- Peng H., Usas A., Olshanski A., Ho A.M., Gearhart B., Cooper G.M. and Huard J. (2005). "VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis." J Bone Miner Res **20**(11): 2017-2027.
- Peng L.H., Ko C.H., Siu S.W., Koon C.M., Yue G.L., Cheng W.H., Lau T.W., Han Q.B., Ng K.M., Fung K.P., Lau C.B. and Leung P.C. (2010). "In vitro & in vivo assessment of a herbal formula used topically for bone fracture treatment." J Ethnopharmacol **131**(2): 282-289.
- Perkins R. and Skirving A.P. (1987). "Callus formation and the rate of healing of femoral fractures in patients with head injuries." J Bone Joint Surg Br **69**(4): 521-524.
- Portal-Nunez S., Lozano D. and Esbrit P. (2012). "Role of angiogenesis on bone formation." Histol Histopathol **27**(5): 559-566.
- Probst A. and Spiegel H.U. (1997). "Cellular mechanisms of bone repair." J Invest Surg **10**(3): 77-86.
- Pulford K.A., Sipos A., Cordell J.L., Stross W.P. and Mason D.Y. (1990). "Distribution of the CD68 macrophage/myeloid associated antigen." Int Immunol **2**(10): 973-980.
- Reed A.A., Joyner C.J., Brownlow H.C. and Simpson A.H. (2002). "Human atrophic fracture non-unions are not avascular." J Orthop Res **20**(3): 593-599.
- Rigaux P., Benabid N., Darriet D., Delecourt C., Chieux V., Dudermeil A.F., Sutter B., Anselme K. and Hardouin P. (2005). "Study of serum factors potentially involved in the pathogenesis of heterotopic bone formation after severe brain injury." Joint Bone Spine **72**(2): 146-149.
- Rivlin A.S. and Tator C.H. (1977). "Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat." J Neurosurg **47**(4): 577-581.
- Rivlin A.S. and Tator C.H. (1978). "Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat." Surg Neurol **10**(1): 38-43.
- Roberts P.H. (1968). "Heterotopic ossification complicating paralysis of intracranial origin." J Bone Joint Surg Br **50.1**: 70-77.
- Rontgen V., Blakytyn R., Matthys R., Landauer M., Wehner T., Gockelmann M., Jermendy P., Amling M., Schinke T., Claes L. and Ignatius A. (2010). "Fracture healing in mice under controlled rigid and flexible conditions using an adjustable external fixator." J Orthop Res **28**(11): 1456-1462.
- Salcedo X., Medina J., Sanz-Cameno P., Garcia-Buey L., Martin-Vilchez S. and Moreno-Otero R. (2005). "Review article: angiogenesis soluble factors as liver disease markers." Aliment Pharmacol Ther **22**(1): 23-30.
- Salisbury E., Rodenberg E., Sonnet C., Hipp J., Gannon F.H., Vadakkan T.J., Dickinson M.E., Olmsted-Davis E.A. and Davis A.R. (2011). "Sensory nerve induced inflammation contributes to heterotopic ossification." J Cell Biochem **112**(10): 2748-2758.

- Santos M.I. and Reis R.L. (2010). "Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges." Macromol Biosci **10**(1): 12-27.
- Scheff S.W., Rabchevsky A.G., Fugaccia I., Main J.A. and Lumppp J.E., Jr. (2003). "Experimental modeling of spinal cord injury: characterization of a force-defined injury device." J Neurotrauma **20**(2): 179-193.
- Schindeler A., McDonald M.M., Bokko P. and Little D.G. (2008). "Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture." Semin Cell Dev Biol **19**(5): 459-466.
- Seebeck P., Bail H.J., Exner C., Schell H., Michel R., Amthauer H., Bragulla H. and Duda G.N. (2005). "Do serological tissue turnover markers represent callus formation during fracture healing?" Bone **37**(5): 669-677.
- Sfeir C., Ho L., Doll B.A., Azari K. and Hollinger J.O. "Fracture healing" in Bone regeneration and repair: biology and clinical applications. Lieberman J.R. and Friedlaender G.E. (2005), Springer: 21.
- Shafritz A.B., Shore E.M., Gannon F.H., Zasloff M.A., Taub R., Muenke M. and Kaplan F.S. (1996). "Overexpression of an osteogenic morphogen in fibrodysplasia ossificans progressiva." N Engl J Med **335**(8): 555-561.
- Shehab D., Elgazzar A.H. and Collier B.D. (2002). "Heterotopic ossification." J Nucl Med **43**(3): 346-353.
- Sider K.L., Song J. and Davies J.E. (2010). "A new bone vascular perfusion compound for the simultaneous analysis of bone and vasculature." Microsc Res Tech **73**(7): 665-672.
- Simpson D.M. and Ross R. (1972). "The neutrophilic leukocyte in wound repair a study with antineutrophil serum." J Clin Invest **51**(8): 2009-2023.
- Skaliczki G., Weszl M., Schandl K., Major T., Kovacs M., Skaliczki J., Redl H., Szendroi M., Szigeti K., Mate D., Dobo-Nagy C. and Lacza Z. (2012). "Compromised bone healing following spacer removal in a rat femoral defect model." Acta Physiol Hung **99**(2): 223-232.
- Soblosky J.S., Colgin L.L., Chorney-Lane D., Davidson J.F. and Carey M.E. (1997). "Ladder beam and camera video recording system for evaluating forelimb and hindlimb deficits after sensorimotor cortex injury in rats." J Neurosci Methods **78**(1-2): 75-83.
- Spencer R.F. (1987). "The effect of head injury on fracture healing. A quantitative assessment." J Bone Joint Surg Br **69**(4): 525-528.
- Stockhammer G., Reindl H., Saltuari L., Spogler F., Benedetto K., Kadlez R. and Frischhut B. (1992). "[Peri-articular calcinosis after craniocerebral trauma--the natural course and treatment concepts]." Orthopade **21**(5): 346-352.
- Stokes B.T. (1992). "Experimental spinal cord injury: a dynamic and verifiable injury device." J Neurotrauma **9**(2): 129-131; discussion 131-124.

- Stover S.L., Niemann K.M. and Tulloss J.R. (1991). "Experience with surgical resection of heterotopic bone in spinal cord injury patients." Clin Orthop Relat Res(263): 71-77.
- Strohfeldt P. (1973). "Das isoliert perfundierte Hinterbein der Ratte als Modell zur Untersuchung des Muskelstoffwechsels." Res Exp Med **162**(1): 7-16.
- Strube P., Mehta M., Baerenwaldt A., Trippens J., Wilson C.J., Ode A., Perka C., Duda G.N. and Kasper G. (2009). "Sex-specific compromised bone healing in female rats might be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity." Bone **45**(6): 1065-1072.
- Svensen C.H. (2004). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) in plasma increases after hip surgery." J Clin Anesth **16**(6): 435-439.
- Taly A.B., Nair K.P., Kumar M.V., Jayakumar P.N., Vasudev M.K., Ravishankar D., Kalaivant P.L., Padankatty B.S. and Murali T. (1999). "Heterotopic ossification in non-traumatic myelopathies." Spinal Cord **37**(1): 47-49.
- Tarkka T., Sipola A., Jamsa T., Soini Y., Yla-Herttuala S., Tuukkanen J. and Hautala T. (2003). "Adenoviral VEGF-A gene transfer induces angiogenesis and promotes bone formation in healing osseous tissues." J Gene Med **5**(7): 560-566.
- Tarlov I.M., Klinger H. and Vitale S. (1953). "Spinal cord compression studies. I. Experimental techniques to produce acute and gradual compression." AMA Arch Neurol Psychiatry **70**(6): 813-819.
- Tator C.H. and Deecke L. (1973). "Value of normothermic perfusion, hypothermic perfusion, and durotomy in the treatment of experimental acute spinal cord trauma." J Neurosurg **39**(1): 52-64.
- Tatsuyama K., Maezawa Y., Baba H., Imamura Y. and Fukuda M. (2000). "Expression of various growth factors for cell proliferation and cytodifferentiation during fracture repair of bone." Eur J Histochem **44**(3): 269-278.
- Termaat M.F., Den Boer F.C., Bakker F.C., Patka P. and Haarman H.J. (2005). "Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects." J Bone Joint Surg Am **87**(6): 1367-1378.
- Tombran-Tink J. and Barnstable C.J. (2004). "Osteoblasts and osteoclasts express PEDF, VEGF-A isoforms, and VEGF receptors: possible mediators of angiogenesis and matrix remodeling in the bone." Biochem Biophys Res Commun **316**(2): 573-579.
- Tow A.P. and Kong K.H. (1995). "Prolonged fever and heterotopic ossification in a C4 tetraplegic patient. Case report." Paraplegia **33**(3): 170-174.
- Trentz O.A., Handschin A.E., Bestmann L., Hoerstrup S.P., Trentz O.L. and Platz A. (2005). "Influence of brain injury on early posttraumatic bone metabolism." Crit Care Med **33**(2): 399-406.

- Trueta J. and Buhr A.J. (1963). "The Vascular Contribution to Osteogenesis. V. The Vasculature Supplying the Epiphyseal Cartilage in Rachitic Rats." J Bone Joint Surg Br **45**: 572-581.
- Trueta J. and Trias A. (1961). "The vascular contribution to osteogenesis. IV. The effect of pressure upon the epiphyseal cartilage of the rabbit." J Bone Joint Surg Br **43-B**: 800-813.
- Vaccaro A.R., Ahmad S.S. and Rauschnig W. "Anatomy and pathophysiology of spinal cord injury" in Spine trauma. Levine A.M., Eismont G.J. and Garfin S.R. Philadelphia (1998), WB Saunders: 75-86.
- van Kuijk A.A., Geurts A.C. and van Kuppevelt H.J. (2002). "Neurogenic heterotopic ossification in spinal cord injury." Spinal Cord **40**(7): 313-326.
- Vanden Bossche L. and Vanderstraeten G. (2005). "Heterotopic ossification: a review." J Rehabil Med **37**(3): 129-136.
- Vanicky I., Urdzikova L., Saganova K., Cizkova D. and Galik J. (2001). "A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat." J Neurotrauma **18**(12): 1399-1407.
- Venier L.H. and Ditunno J.F., Jr. (1971). "Heterotopic ossification in the paraplegic patient." Arch Phys Med Rehabil **52**(10): 475-479.
- Wang D., Shurafa M.S., Acharya R., Strand V.F. and Linden M.D. (2004). "Chronic abdominal pain caused by heterotopic ossification with functioning bone marrow: a case report and review of the literature." Arch Pathol Lab Med **128**(3): 321-323.
- Wendeberg B. (1961). "Mineral metabolism of fractures of the tibia in man studied with external counting of Sr85." Acta Orthop Scand Suppl **52**: 1-79.
- Wenger D.R., Jeffcoat B.T. and Herring J.A. (1980). "The guarded prognosis of physeal injury in paraplegic children." J Bone Joint Surg Am **62**(2): 241-246.
- Werner S. and Grose R. (2003). "Regulation of wound healing by growth factors and cytokines." Physiol Rev **83**(3): 835-870.
- Wharton G.W. and Morgan T.H. (1970). "Ankylosis in the paralyzed patient." J Bone Joint Surg Am **52**(1): 105-112.
- Whishaw I.Q., Li K., Whishaw P.A., Gorny B. and Metz G.A. (2008). "Use of rotorod as a method for the qualitative analysis of walking in rat." J Vis Exp(22).
- Wildburger R., Zarkovic N., Egger G., Petek W., Meinitzer A., Borovic S., Zarkovic K., Li L., Stipancic I., Trbojevic-Cepe M. and et al. (1995). "Comparison of the values of basic fibroblast growth factor determined by an immunoassay in the sera of patients with traumatic brain injury and enhanced osteogenesis and the effects of the same sera on the fibroblast growth in vitro." Eur J Clin Chem Clin Biochem **33**(10): 693-698.

- Wildburger R., Zarkovic N., Egger G., Petek W., Zarkovic K. and Hofer H.P. (1994). "Basic fibroblast growth factor (BFGF) immunoreactivity as a possible link between head injury and impaired bone fracture healing." Bone Miner **27**(3): 183-192.
- Wildburger R., Zarkovic N., Leb G., Borovic S., Zarkovic K. and Tatzber F. (2001). "Post-traumatic changes in insulin-like growth factor type 1 and growth hormone in patients with bone fractures and traumatic brain injury." Wien Klin Wochenschr **113**(3-4): 119-126.
- Wildburger R., Zarkovic N., Tonkovic G., Skoric T., Frech S., Hartleb M., Loncaric I. and Zarkovic K. (1998). "Post-traumatic hormonal disturbances: prolactin as a link between head injury and enhanced osteogenesis." J Endocrinol Invest **21**(2): 78-86.
- Wittenberg R.H., Peschke U. and Botel U. (1992). "Heterotopic ossification after spinal cord injury. Epidemiology and risk factors." J Bone Joint Surg Br **74**(2): 215-218.
- Wong H.L. and Wahl S.M. "Inflammation and repair" in Peptide growth factors and their receptors II. Sporn M.B. and Roberts A.B. New York (1990), Springer-Verlag: 509-548.
- Wozney J.M. (2002). "Overview of bone morphogenetic proteins." Spine (Phila Pa 1976) **27**(16 Suppl 1): S2-8.
- Wu D., Malda J., Crawford R. and Xiao Y. (2007). "Effects of hyperbaric oxygen on proliferation and differentiation of osteoblasts from human alveolar bone." Connect Tissue Res **48**(4): 206-213.
- Zhang D., Zhang P., Wang Y., Han N., Tang C. and Jiang B. (2009). "The influence of brain injury or peripheral nerve injury on calcitonin gene-related peptide concentration variation and fractures healing process." Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol **37**(2): 85-91.
- Zhang Z.Y., Teoh S.H., Chong M.S., Lee E.S., Tan L.G., Mattar C.N., Fisk N.M., Choolani M. and Chan J. (2010). "Neo-vascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femoral defects." Biomaterials **31**(4): 608-620.

9. Tabellarischer Anhang

9.1 Material

9.1.1 Tierhaltungsmaterialien und OP-Bedarf

Material	Hersteller
Babygrießbrei Vanille	BebeVita, dm-drogerie markt GmbH&Co KG
Einstreu	Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Gitterdeckel	Tecniplast DE GmbH, Hohenpeißenberg
Makrolonkäfige Typ IV	Tecniplast DE GmbH, Hohenpeißenberg
Nagerfutter	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Tränkeflaschen und -kappen	Tecniplast DE GmbH, Hohenpeißenberg
Braunol 7,5 % Lösung	B.Braun Melsungen GmbH, Melsungen
Braunosan Vet	B.Braun Melsungen GmbH, Melsungen
Braunülen	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Chirurgisches Nahtmaterial	Ethicon Inc, Norderstedt
ES-Kompressen	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Infusionsschlauch	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Setpack Präpanettupfer RK	L & R GmbH&Co.KG, Neuwied
Skalpelle	Feather
Spritzen und Kanülen	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Sterile Abdecktücher	L & R GmbH&Co.KG, Neuwied
Sterile Endoskophüllen	3M Deutschland GmbH, Neuss
Sterile Handschuhe	Semperit Techn.Produkte GmbH, Gevelsberg
Sterile Inzisionsfolie	3M Deutschland GmbH, Neuss
Sterile Kittel	3M Deutschland GmbH, Neuss
Wundklammern nach Michel	Henry Schein Vet GmbH, Hamburg
Zinkoxid-Spray	Henry Schein Vet GmbH, Hamburg
Bohrer (DrillBit 0,68 mm)	AO Research Institute, Davos, Schweiz
Bohrfutter	BAUHAUS E-Business GmbH & Co. KG, Mannheim

Dremel 10,8 V Modell 800	BAUHAUS E-Business GmbH & Co. KG, Mannheim
OP-Bestecke	Aesculap AG, Tuttlingen FST GmbH, Heidelberg
Platten (RatFixPlate, 8 hole, 23 mm)	AO Research Institute, Davos, Schweiz
Röntgenkontrastmittel (Microfil®)	Flow Tech Inc, Massachusetts, USA
Sägedraht (Gigly wire saw 0,22 mm)	AO Research Institute, Davos, Schweiz
Schermaschine Electra II	Aesculap AG, Tuttlingen
Schrauben (RatFixScrew, 0,7 x 6,5 mm)	AO Research Institute, Davos, Schweiz
Thermometer Microlife Vet Temp	Henry Schein Vet GmbH, Hamburg
Wärmeplatte Hot Plate 062	Labotect GmbH, Göttingen
Wärmematte Gaymar, T/Pump Professional	Invatech, GmbH&Co.KG, Hamburg

9.1.2 Medikamente

Wirkstoff / Handelsname	Hersteller
Atipamezolhydrochlorid (Antisedan ®)	Jansson Pharmaceutica NV, Beerse, Belgien
Buprenorphin (Temgesic ®)	Reckitt Benckiser GmbH, Mannheim
Dexapanthenol (Bepanthen Augensalbe ®)	Bayer Pharma AG, Berlin
Doxapramhydrochlorid (Doxapram-V ®)	Albrecht GmbH, Aulendorf
Fentanyl	Jansson-Cilag GmbH, Neuss
Flumazenil (Flumazenil Kabi ®)	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
Gentamicinsulfat (Refobacin ®)	Merck KGaA, Darmstadt
Glucosemonohydrat (Glucose 5 %)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Heparin-Natrium 25.000 ®	ratiopharm GmbH, Ulm
Ketaminhydrochlorid (Ketamin 10 %)	Medistar Arzneimittel Vertrieb GmbH, Holzwickede
Medetomidinhydrochlorid (Domitor ®)	Jansson Pharmaceutica NV, Beerse Belgien
Midazolam (Dormicum ®)	Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen
Naloxonhydrochlorid (Naloxon Inresa ®)	Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg
Natriumchlorid (NaCl 0,9 %)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Xylazinhydrochlorid (Rompun 2 % ®)	Bayer Pharma AG, Berlin

9.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien / Reagenzien	Hersteller
Aceton	Carl Roth GmbH & Co KG, Münster
Aquatex	Merck KGaA, Darmstadt
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EDTA	Carl Roth GmbH & Co KG, Münster
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co KG, Münster
Eosin	Waldeck GmbH & Co Division Chroma, Münster
Fast Red	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim
Giemsa Lösung, Fluka	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hämalaun nach Meyer	Waldeck GmbH & Co Division Chroma, Münster
HCL	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropanol 70 % / 96 % / 100 %	Carl Roth GmbH & Co KG, Münster
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt
Paraffin (Surgipath Paraplast X-tra)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
PFA	Merck KGaA, Darmstadt
Roti-Histokit®	Carl Roth GmbH & Co KG, Münster
Roti-Histol®	Carl Roth GmbH & Co KG, Münster
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane	Merck KGaA, Darmstadt
Xylol	Carl Roth GmbH & Co KG, Münster

9.1.4 Puffer und Lösungen

Puffer / Lösungen	Hersteller
PBS-Puffer	8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na ₂ HPO ₄ , 0,24 g/l KH ₂ PO ₄ , pH 7,5
PFA 4 %	40 g/l PFA in PBS
TBS-Puffer	60,7 g/l Tris, 87,65 g/l NaCl

9.1.5 Enzyme und Antikörper

Enzyme / Antikörper	Hersteller
Mouse anti-rat CD68	Abcam pic, Cambridge, UK
Proteinase K	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim
Goat anti-Mouse IgG	Jackson IR Laboratories Inc., USA

9.1.6 Farblösungen und Kits

Farblösung / Kits	Hersteller
BALP-ELISA (Cusabio)	Hölzel Diagnostika, Köln
Vectastain Elite- ABC-Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
VEGF-ELISA (Cusabio)	Hölzel Diagnostika, Köln

9.1.7 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Handschuhe (Latex)	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Handschuhe (Nitril)	Ansell GmbH, München
Objektträger	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Reaktionsgefäße bis 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße bis 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

9.1.8 Geräte und Software

Geräte / Software	Hersteller
AxioCam HRC	Carl Zeiss AG, Oberkochen
ELISA-Reader	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Heizplatte Medax	Medax GmbH & Co KG, Münster

Heizplatten-Magnetrührer MR 3001 K	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Kehlheim
IBM SPSS Statistics® Version 18.0	IBM Corporation, New York, US
Impactor IH-0400	Precision Systems and Instrumentation, LLC
In-vivo Mikro-Computertomograph 1076	Skyscan, Antwerpen, Belgien
Laborschüttler UNI MAX 1010	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Kehlheim
Microsoft EXEL Version 2003	Microsoft Corporation, Redmond, US
Mikroskop Axioplan2 Imaging	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop Olympus BH2	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Paraffinstreckbad Kunz Instruments	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
pH-Meter PB-11	Sartorius AG, Göttingen
Schlittenmicrotom Jung Histoslide 2000R	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Vakuumschrank Vacutherm	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Vortex-Gerät	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Kehlheim
Wärmeschrank	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Zentrifuge Megafuge 3.0 R	MS-L GmbH, Dielheim
Zentrifuge Biofuge Pico	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau

9.2 BBB-Score-Kategorien

Tabelle entnommen aus Basso et al. 1996

Score	Characteristics
0	No observable hindlimb (HL) movements
1	Slight movement of one or two HL joints
2	Extensive movement of one HL joint and possible slight movement of two HL joints
3	Extensive movement of two HL joints
4	Slight movement of all three HL joints
5	Slight movement of two HL joints and extensive movement of HL third joint
6	Extensive movement of two HL joints, slight movement third HL joint
7	Extensive movement of all three HL joints
8	Sweeping with no weight support
9	Plantar placement with weight support in stance only or occasional frequent or consistent weight-supported dorsal stepping and no plantar stepping
10	Occasional weight-supported steps with no forelimb-hindlimb (FL-HL) coordination
11	Frequent to consistent weight-supported steps and no FL-HL coordination
12	Frequent to consistent weight-supported steps and occasional FL-HL coordination
13	Frequent to consistent weight-supported steps and frequent FL-HL coordination
14	Consistent coordinated plantar stepping, predominant paw position is rotated at initial contact and liftoff; frequent plantar stepping, consistent FL-HL coordination and occasional dorsal stepping
15	Consistent coordinated plantar stepping; no or occasional toe clearance during forward limb advancement, predominant paw position is parallel at initial contact
16	Consistent coordinated plantar stepping, frequent toe clearance and predominant paw position is parallel at initial contact and rotated at lift-off
17	Consistent coordinated plantar stepping, frequent toe clearance and predominant paw position is parallel at initial contact and lift-off
18	Consistent coordinated plantar stepping, consistent toe clearance and predominant paw position is parallel at initial contact and lift-off
19	Consistent coordinated plantar stepping, consistent toe clearance and predominant

	paw position is parallel at initial contact and lift-off, tail is down part of all the time
	Consistent coordinated plantar stepping, consistent toe clearance and predominant
20	paw position is parallel at initial contact and lift-off; tail consistently up and trunk instability
	Consistent coordinated gait, consistent toe clearance and predominant paw
21	position is parallel at initial contact and lift-off, tail consistently up and consistent trunk stability

9.3 Mittelwerte der Ergebnisse

9.3.1 Vessel Volume (mm³)

	Kontrollgruppe	Paraplegiegruppe
3 Tage	1,05	1,78
7 Tage	1,14	0,63
14 Tage	1,33	0,83

9.3.2 Vessel Surface (mm²)

	Kontrollgruppe	Paraplegiegruppe
3 Tage	71,18	148,44
7 Tage	84,78	64,86
14 Tage	124,15	74,78

9.3.3 Anzahl der Gefäße (x pro mm²)

	Kontrollgruppe	Paraplegiegruppe
3 Tage	2,19	2,3
7 Tage	10,55	5,78
14 Tage	16,7	18,55

9.3.4 Flächenanteil von CD68-positiven Zellen am weichen Regenerationsgewebe (%)

	Kontrollgruppe	Paraplegiegruppe
7 Tage	1,66	0,77
14 Tage	2,11	3,21

9.3.5 VEGF-Konzentration im Plasma (pg / ml)

	Kontrollgruppe	Paraplegiegruppe	Ohne OP
3 Tage	2,826	2,280	
7 Tage	3,303	2,038	
14 Tage	2,068	2,061	
Ohne OP			1,705

9.3.6 BALP-Konzentration im Plasma (ng / ml)

	Kontrollgruppe	Paraplegiegruppe	Ohne OP
3 Tage	6761,6	7238	
7 Tage	7678,1	6187,8	
14 Tage	6598,3	4561,2	
Ohne OP			4793,2

10. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Wenisch für die Annahme als Doktorandin bedanken. Trotz größerer Entfernung erfuhr ich bei ihr die fachlich kompetenteste und sympathischste Betreuung, die ich mir hätte wünschen können. Vielen Dank für die Bemühungen, mich in jeder Lage weiterzubringen.

Meinem Betreuer PD Dr. Egermann danke ich für die Bereitstellung des interessanten Dissertationsthemas, die offene und ehrliche Art und die Möglichkeit in einem tollen Team das wissenschaftlich-experimentelle Arbeiten kennenzulernen. In diesem Rahmen möchte ich auch der Leiterin der Forschungsabteilung Frau Prof. Dr. Richter für die Bereitstellung des Labors, der Gerätschaften und vieler Gebrauchsgegenstände danken.

Für den fachlichen Input bezüglich der Rückenmarkskontusion und histologischen Untersuchung von Nervengewebe, einschließlich OP-Methode und Cryoschnittanfertigung, und die Erlaubnis der Verwendung aller benötigten Geräte danke ich Herrn Prof. Dr. Weidner, Herrn Prof. Dr. Blesch und seiner AG.

Ganz besonders danke ich meiner Kollegin und Freundin Viviana Grajales Robles für die tolle Zusammenarbeit. Als OP- und Narkoseassistentin ist sie mit mir durch dick und dünn gegangen, hat die liebevolle Tierbetreuung in meiner Abwesenheit übernommen, half beim Austüfteln neuer Ideen und Theorien und war eine sehr große Hilfe in allem, was die praktische Umsetzung im OP betraf. Vielen Dank für die anstrengenden, gemeinsamen Stunden, die du auch nachts im OP und Labor neben mir ausgeharrt hast, die aufbauenden Worte und die gute Unterstützung, ohne die ich es nie geschafft hätte!!

Auch Elisabeth Seebach war mir als tatkräftige und zuverlässige Unterstützung im OP und Labor eine sehr große Hilfe. Gemeinsam sind wir in vielen Dingen so viel weitergekommen. Vielen Dank für den enormen wissenschaftlichen Input, die Hilfe bei der ELISA-Etablierung, dein Wissen über PCs und PC-Programme und das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Vielen Dank an Gesa Zass, die mir mit tierärztlichem Rat zur Seite stand; Elena Tripel für die Hilfe im OP und Labor; Holger Kleinschmidt für die OP-Unterstützung auch am Wochenende und Birgit Frey für die Hilfe in der Histologie. Außerdem vielen lieben Dank an Claudia Rimmele, Jessica Gabler, Patrick Göthlich, Nicole Buchta und Nadine Werth für das immer

mal wieder Einspringen, wenn Not am Mann (bzw. an der Frau) war. Auch an das ganze restliche Team: Dankeschön, ihr seid die Besten! Ich hätte mir nie erträumen lassen, dass ein Betriebsklima so toll und produktiv sein kann und dass Kollegen so schnell zu Freunden werden, die ich auch privat nicht mehr missen möchte.

Danke auch an meinen Freund Michael, an meine Mitbewohner und alle meine Freunde, die mich außerhalb meines Arbeitsumfeldes gestärkt haben.

Bevor ich mich auch noch bei den Ratten bedanke, die mir das Arbeiten überhaupt ermöglicht haben und bei meinem Computer, den ich zu bestimmten Zeiten am liebsten aus dem Fenster geschmissen hätte und mit dem ich doch so viele Stunden verbracht habe, möchte ich auch noch meine Familie erwähnen: meine Mom – Iris, meinen Dad – Gerd und meinen kleinen Bruder – Kim. Ich kann euch gar nicht sagen, wie dankbar ich euch bin. Ihr seid die beste Familie, die ich mir nur wünschen kann. Ich liebe euch über alles und danke euch so sehr für das einfach nur „da sein“, egal zu welcher Tages- und Nachtzeit, für das Mut machen und Aufbauen, vor allem in der Anfangsphase und für die Unterstützung, die ich von euch in jeder Lebenslage erhalte. Vielen Dank, dass ihr an mich glaubt und dass ich mich immer auf euch verlassen kann. Ohne euch wäre ich niemals so weit gekommen!

11. Erklärung

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Beerfelden, 10.03.2014



Svenja Schäfer